ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR QUANTITATIVEN C3b-BESTIMMUNG IM MENSCHLICHEN SERUM MIT HILFE DER IMMUNFLUORESZENZTECHNIK UND IHRE ANWENDUNG

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Renate Stiller-Winkler

Düsseldorf 1984

ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR QUANTITATIVEN C3b-BESTIMMUNG IM MENSCHLICHEN SERUM MIT HILFE DER IMMUNFLUORESZENZTECHNIK UND IHRE ANWENDUNG

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Renate Stiller-Winkler

Düsseldorf 1984

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.1984

Dekan	:	Prof. Dr. J. Kranz
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H.-W. Schlipköter
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. G. Schneider
3. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Weiss

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.med. H.-W. Schlipköter, Direktor des Hygiene-Instituts, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und für die Förderung der experimentellen Arbeit.

Für die zahlreichen Anregungen und kritischen Diskussionen danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. G. Schneider.

Frau Priv.-Doz. Dr.med. H. Idel danke ich sehr für die stete Unterstützung, Beratung und Hilfe bei meiner Arbeit.

Frau U. Krämer danke ich für ihre Mitarbeit bei der statistischen Auswertung.

Für die technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche sei Frau R. Thelen und Frau B. Schulten herzlichst gedankt.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I. Einleitung		
1.	Das Komplementsystem	1
2.	Komplementaktivierung	3
3.	Komplementdefekte bei Menschen und Tieren	9
4.	Klinische Bedeutung des Komplements	10
5.	Die dritte Komplementkomponente	10
6.	Komplement-Bestimmungsmethoden	13
II. Problemstellung der eigenen Untersuchungen		16
III. Material und Methoden		
1.1	Versuchstiere	17
1.2	Humanseren als Komplementquelle	17
1.3	Konjugate von Antiseren	18
1.4	Radiale Immundiffusion (RID) zum Nachweis von C3c	18
1.5	Herstellung des nephrotoxischen Antiserums	20
1.6	Rattennierengewebe als Substrat für die C3b-Bindung	22
1.7	Methode der Anti-Komplement-Immunfluoreszenz	22
1.8	Optisches System und Messung der Fluoreszenzintensität	25
IV. Ergebnisse		
Quantitative C3b-Bestimmung mit Hilfe fluoreszenzserologischer Messungen an histologischen Schnitten		27
1.	Eigenschaften des Substrates zur C3b-Bindung	27
1.1	Vorkommen von spezifischen AgAk-Komplexen	27
1.2	Klassifikation der Antikörper des AgAk-Komplexes	30
1.3	Stabilität des AgAk-Komplexes in den Rattennierenschnitten	32
2.	Einfluß von immunologischen und physikalisch-chemischen Faktoren auf die C3b-Bestimmung der Seren	34
2.1	Abhängigkeit der Reaktion von der Verdünnung des Konjugates und des Humanserums	34

Seite

2.1.1 Spezifität des Konjugates 34

2.1.2 Verdünnung des Konjugates 35

2.1.3 Verdünnung des Humanserums 37

2.2 Untersuchungen über den Einfluß der FI-Messung auf die C3b-Werte 40

2.3 Bedeutung von Lagerungszeit und -temperatur der Seren 42

3. C3b-Bestimmung mit dem Immunfluoreszenztest und C3c-Messung mit der Methode der radialen Immundiffusion: Vergleich der Ergebnisse 46

4. Anwendung der Methode zur quantitativen Bestimmung von C3b 51

4.1 Untersuchungen über den Einfluß der Jahreszeiten, des Alters und Geschlechts auf den C3b-Gehalt des Serums gesunder Personen 51

4.2 C3b-Bestimmungen in Seren von schwangeren Frauen. Einfluß des Stadiums der Schwangerschaft, der Jahreszeiten und der Blutgruppenzugehörigkeit 57

4.3 C3b-Bestimmungen in Seren von gesunden 60jährigen Männern aus Wohngebieten mit unterschiedlicher Schadstoffbelastung in der Luft (Duisburg und Gummersbach) 60

V. Diskussion

1. Möglichkeiten der quantitativen C3b-Bestimmung mit Hilfe fluoreszenzserologischer Messungen an histologischen Schnitten 62

2. Ergebnisse der C3b-Bestimmung 67

2.1 C3b-Werte bei einem gesunden Personenkollektiv 67

2.1.1 Die Abhängigkeit der C3b-Konzentration von der Jahreszeit 67

2.1.2 Die Abhängigkeit der C3b-Konzentration vom Lebensalter 69

2.2 C3b-Werte im Verlauf einer normalen Schwangerschaft 70

2.3 Vergleich der C3b-Werte von Personen aus Gebieten mit unterschiedlich starker Luftverunreinigung 73

VI. Zusammenfassung 76

Literaturverzeichnis 78

I. Einleitung

1. Das Komplementsystem

Ein internationales Komitee der Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat im Jahre 1968 folgende Definition für das Komplement (C) empfohlen: "Komplement ist ein System von neun Proteinen im frischen Normalserum von Warmblütern, welches unter definierten Bedingungen zur Hämolyse von sensibilisierten Erythrozyten (EA) fähig ist; bei diesem Vorgang werden eine Reihe biologisch aktiver Substanzen freigesetzt" (167).

Die Grundlage dieser Definition des Komplementsystems, die Immunhämolyse, wurde schon im Jahre 1898 von Bordet (14) und 1899 von Ehrlich und Morgenroth (37) beschrieben. Bordet beobachtete, daß Kaninchenantiseren gegen Schaferythrozyten in frischem Zustand die Erythrozyten lysieren, jedoch durch Altern und Erhitzen diese Eigenschaft verlieren können. Diesen zuerst unbekannten, hitzelabilen Faktor fand Bordet im frischen Serum verschiedener Tierarten und bezeichnete ihn damals als "Alexin", was später durch den Namen "Komplement" ersetzt wurde. Das neu entdeckte "Alexin" hatte in dieser Zeit keine praktische Bedeutung für die Serologie; erst mit der Entwicklung der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) wurde das Komplement in die Laboratoriumsdiagnostik eingeführt, und man widmete diesem Serumfaktor mehr Aufmerksamkeit, da man den Komplementverbrauch an einem Indikatorsystem ablesen und so den Ablauf einer Antigen-Antikörper-Reaktion bestimmen konnte. Das Komplement wurde nicht nur beim Menschen, sondern auch im Blut von vielen anderen Säugetieren, von Vögeln, Lurchen, Knorpel- und Knochenfischen nachgewiesen. Die Komplementkomponenten von Mensch, Schwein und Meerschweinchen sind funktionell austauschbar; bei Huhn, Schaf und Ziege sind jedoch die gegen Erythrozyten gerichteten Antikörper nicht in der Lage, das Komplement anderer Spezies zu aktivieren und eine Hämolyse auszulösen (63).

Die Komplementkomponenten verschiedener Spezies sind im Blut in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden.

In den fünfziger Jahren haben Pillemer u. Mitarb. (113) ältere Befunde über das Komplement des Menschen und des Meerschweinchens zusammengestellt und schon damals gezeigt, daß das Komplement des Menschen und des Meerschweinchens körpereigene Substanz ist, die mindestens vier verschiedene Komponenten enthält. Die physiologische Bedeutung des Komplements in vivo blieb jedoch vorerst unbekannt.

In den sechziger Jahren war bereits bekannt, daß Komplement aus neun Komponenten besteht und durch Anlagerung an Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert wird (73-76; 107). Obwohl die Bedeutung des Komplementsystems auch heute noch nicht in jeder Einzelheit geklärt ist, besteht kein Zweifel, daß das Komplement neben den Immunglobulinen ein wichtiger Teil des humoralen Abwehrsystems ist, da es bei entzündlichen Reaktionen, der Erregerabwehr und bei der Antigenverarbeitung eine bedeutende Rolle spielt (54; 108).

Heute weiß man, daß das Komplement ein Zellaktivator ist, der 11 Proteine (C1 - C9) umfaßt. Die erste Komponente C1 besteht aus drei Untereinheiten, $C1_q$, $C1_r$ und $C1_s$, die als einzelne Proteine vorliegen oder durch den Einfluß von Ca^{++}-Ionen zu C1 zusammengeschlossen sein können.

Alle Komplementkomponenten wurden inzwischen rein dargestellt und charakterisiert (Tab. 1).

Die Biosynthese der Komplementkomponenten erfolgt in Makrophagen (24), Monozyten, Fibroblasten, Epithelzellen (134) und in der Leber in den Kupfferschen Sternzellen (124) sowie in Hepatozyten (117).

Komponente	Elektrophoretische Beweglichkeit	Molekular-Gewicht	mittlere Serumkonzentration (µg/ml)
C 1		900.000	300 - 400
C 1q	γ_2	400.000	180
C 1r	β	190.000	100
C 1s	α_2	80.000	80
C 2	β_2	115.000	25
C 3	β_1	180.000	1300
C 4	β_1	206.000	450
C 5	β_1	180.000	80
C 6	β_2	128.000	60
C 7	β_2	121.000	60
C 8	γ_1	154.000	70
C 9	α	80.000	200

Tab. 1: Die Komponenten des Komplementsystems.

2. Komplementaktivierung

Die Bezeichnung der Komplementkomponenten C1 - C9 entspricht der Reihenfolge ihrer Beschreibung bzw. ihrer Entdeckung, aber nicht ihrer Position in der Reaktionsfolge. Die Zahlenreihe der Sequenz im Reaktionsablauf ist nicht C1 bis C9, sondern: C1 - C4 - C2 - C3 - C5 - C6 - C7 - C8 - C9. Alle Komplementkomponenten liegen im Plasma als funktionell inaktive Vorläufermoleküle vor und entfalten erst nach der Aktivierung enzymatische Eigenschaften.

Die dritte Komponente C3 ist das wichtigste Protein im ge-

samten Komplementsystem und alle Aktivierungswege führen über die Komplementkomponente C3.

Zur Zeit sind drei Möglichkeiten der Komplementaktivierung bekannt: der klassische Weg, der alternative Weg und die direkte C3-Spaltung.

Der klassische Weg ist der am längsten bekannte Aktivierungsweg des Komplementsystems. Diese Aktivierung ist nur möglich, wenn ein Antigen-Antikörper-Komplex vorliegt und es zu einer Reaktion unter Beteiligung aller Komponenten von C1 bis C9 kommt.

Im humanen Komplementsystem können nur Antikörper der IgG- und IgM-Klasse diese kaskadenartige Reaktion in Gang setzen. Als Beispiel der klassischen Komplementaktivierung durch Antigen-Antikörper-Komplexe wird die Immunhämolyse sensibilisierter Erythrozyten (EA) dargestellt (Abb. 1).

Der erste Schritt zur Komplementaktivierung ist die Konformationsänderung in der Fc-Region des Antikörpers. Durch die Bindung des Antikörpers an das Antigen wird das Fc-Fragment des Antikörpers sterisch so verändert, daß sich die C1-Untereinheit $C1_q$ in Gegenwart von Ca-Ionen anlagern kann; diese Anlagerung führt weiter zur Aktivierung von $C1_r$, zu einer aktiven Protease, welche die $C1_s$-Proesterase zur $C1_s$-Esterase aktiviert. Die $C\bar{1}$-Esterase ($C\bar{1}$) wirkt auf die beiden Komponenten C4 und C2 enzymatisch ein und spaltet diese jeweils in die Fragmente a und b. In Gegenwart von Mg^{++}-Ionen kommt es zur Bildung der C3-Konvertase (C4b, 2a) und eines neuen Intermediärkomplexes (EAC1, 4b, 2a). Die $C\bar{3}$-Konvertase wirkt auf das native C3 und spaltet dieses in zwei Bruchstücke: C3a und C3b. Das größere Bruchstück C3b bindet sich an einen Akzeptor, z.B. auf der Plasmamembran. Danach lagert sich C5 an und es kommt zur Abspaltung von C5a. Es entsteht ein Zwischenkomplex EAC1, 4b, 2a, 3b, 5b. Die Bruchstücke C3a und C5a wirken als Anaphylatoxine und werden von der Carboxypeptidase B reguliert.

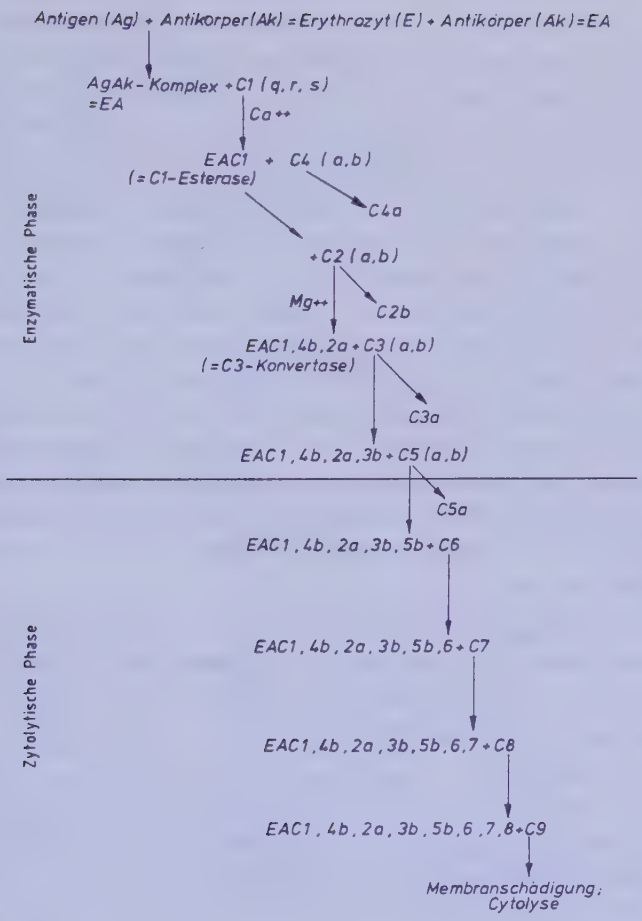

Abb. 1: Komplement (C) Aktivierung des "klassischen Weges"

Bis zu diesem Stadium stellt die Komplementaktivierung eine Kette von enzymatischen Reaktionen dar. Mit den weiteren C-Komponenten beginnt die zytolytische Phase der Komplementaktivierung. Durch Anlagerung von C6 und C7 entsteht ein Membranenangriffskomplex (MAK), der sich an die Oberfläche

der Zielzelle anlagert. Drei Serumproteine, nämlich der MAK-Inhibitor, das Antithrombin und das Lipoprotein, kontrollieren den MAK-Anlagerungsprozeß. Jedes von diesen Proteinen kann sich an den MAK-Komplex binden und die Anlagerung des Komplexes an die Zelloberfläche verhindern (13; 54; 81; 95; 96; 97).

Weiterhin verbinden sich C8 und C9 mit dem MAK-Angriffskomplex (Abb. 1). Dabei entsteht ein Zwischenkomplex, der zur Bildung von trichterförmigen Kanälen in der Lipidschicht der Zellmembran führt (97). Durch diese Kanäle kommt es zum Ausstrom von Kalium-Ionen und zum Einstrom von Natrium-Ionen und Wassermolekülen. Die Zelle wird lysiert. Einige Zellen, z.B. Tumorzellen oder Leukozyten, verfügen über ein leistungsfähiges Reparatursystem und können viele Tausende von lytischen Komplementtreffern kompensieren; dagegen führt bei Erythrozyten jeder einzelne Treffer zum Zelltod (54; 134). Die molekularen Vorgänge der Membranschädigung sind noch nicht in allen Einzelheiten geklärt.

Der Aktivierungsweg ohne Beteiligung von Antigen-Antikörper-Komplexen wird als Nebenschlußaktivierung oder "alternativer Weg" bezeichnet ("alternative pathway", Abb. 2).

Hierbei können verschiedene Substanzen, wie Polysaccharide (Dextran, Sephadex), Lipopolysaccharide (Endotoxine), Agar, Zymosan, Inulin und andere, die Komplementaktivierung auslösen (158). Die Bedeutung dieser Aktivierungsmöglichkeit liegt darin, daß die biologischen Leistungen des Komplementsystems auch dann genutzt werden können, wenn keine bzw. zu wenig spezifisch reagierende Antikörper im Organismus vorhanden sind (97). Bei diesem Aktivierungsweg spielen viele Plasmaproteine eine bedeutende Rolle (Tab. 2).

Die wichtigste Reaktion der alternativen Aktivierung ist die positive Rückkoppelung in der Spaltung von C3 und durch die C3-Konvertase (C3bBbP).

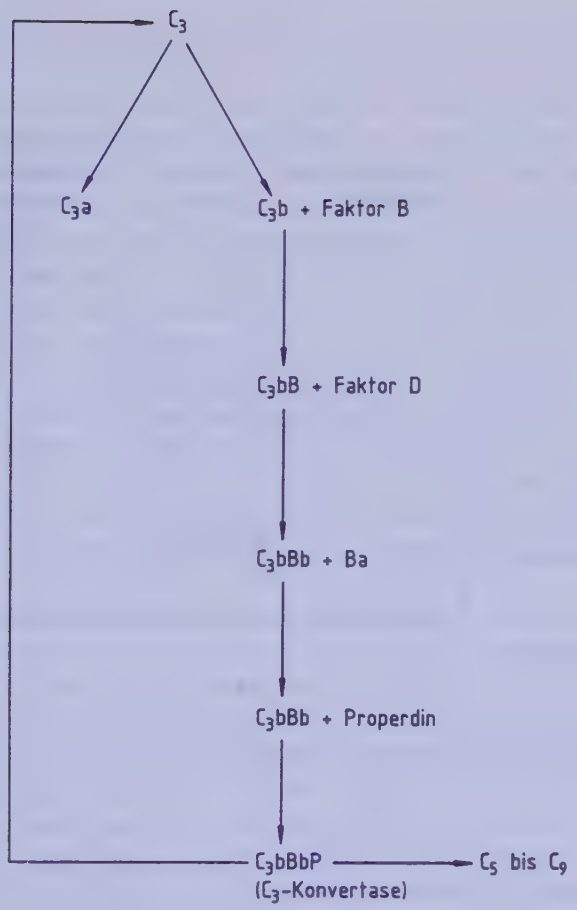

Abb. 2: C3 Aktivierung des "alternativen Weges".

Falls es im Organismus zur Spaltung von C3 kommt und auch nur geringe Mengen an C3b vorhanden sind, lagert sich der native Faktor B an und wird durch den Faktor D, die Proaktivatorkonvertase, die als aktives Enzym im Serum vorliegt, in die Bruchstücke Ba und Bb gespalten. Das Fragment Ba wirkt vermutlich chemotaktisch auf segmentkernige Leukozyten (134).

Protein (Synonym)	Elektrophoretische Beweglichkeit	Molekular-Gewicht	mittlere Serumkonzentration (µg/ml)
Faktor B (C_3b-Proaktivator)	β_2	93,000	200
Faktor D (C_3-Proaktivator-Konvertase)		24.000	2,5
Properdin		184.000	25
β 1 H (C_3b-INA-Accelerator)	β_1	150.000	130
C_3b INA (Konglutinin aktivierender Faktor, KAF)	β_1	100.000	30

Tab. 2: Proteine des alternativen Komplement-Aktivierungsweges.

Bb bildet mit C3b einen Komplex, der nur geringe Halbwertzeit aufweist. Das Enzym C3bB wird durch Properdin (P) stabilisiert. So entsteht der C3BbP-Komplex, die C3-Konvertase des alternativen Weges, welche das native C3 in C3a und C3b spalten kann (Abb. 2), so daß C3b erneut den Faktor B binden kann, oder der C3BbP-Komplex spaltet die Komponente C5, wodurch die weitere Aktivierungskaskade in Gang gesetzt wird. Der weitere Reaktionsablauf folgt dann dem sogenannten "klassischen Weg". Diese Reaktion wird von zwei Proteinen, dem ßlH- und C3b-Inaktivator, inhibiert (Abb. 2). Das Serumglykoprotein ßlH spaltet Bb vom C3b-Molekül ab; somit wird die Bildung einer stabilen C3-Konvertase verhindert und C3b für die Spaltung durch die spezifische Endopeptidase, nämlich den C3b-Inaktivator, zugänglich gemacht. Das freie Bb kann Makrophagen aktivieren und zur

Ausbreitung der peripheren Monozyten führen (118). Für den Faktor D wurde bisher kein Inhibitor in vivo gefunden. Eine weitere Möglichkeit der Komplementaktivierung ist die direkte C3-Spaltung.

Verschiedene körpereigene Enzyme, z.B. Trypsin, Thrombin, Plasmin wie auch traumatisch freigesetzte Gewebeproteasen, können C3 spalten und damit die alternative Aktivierungskaskade in Gang setzen (54).

Da auch einige bakterielle Enzyme die Fähigkeit besitzen C3 zu spalten (30a; 118), liegt die Vermutung nahe, daß die direkte C3-Spaltung in Entzündungsherden abläuft (42).

Die Komplementaktivierung kann in vitro durch verschiedene Substanzen, die Ca^{++}- oder Mg^{++}-Komplexe binden, gehemmt werden. Als Komplementinhibitoren sind unter anderem folgende Substanzen bekannt: Citrate, EDTA, Ammoniak, Hydrazin, Alkylphosphate und Medikamente wie Aspirin, Streptomycin, Chinin und Cortison (164).

Im normalen Organismus überwiegt die Inaktivierung des Komplementes gegenüber der Aktivierung (118). Um seine zytolytische Wirksamkeit zu steuern und mögliche pathologische Reaktionen zu verhindern, enthält das menschliche Serum eine Reihe von natürlichen Inhibitoren, den C1-Inaktivator, das C4-bindende Protein, den C3b-Inaktivator, das β1H-Protein und die Carboxypeptidase B.

3. Komplementdefekte bei Menschen und Tieren

Genetisch bedingte Defekte einzelner Komplementkomponenten wurden bei Menschen wie auch bei Tieren beschrieben (1; 2; 3; 4; 11; 12; 38; 42; 46; 54; 63; 101). Die Entstehung dieser Mängel kann unterschiedlich sein. So kann durch das Fehlen eines Gens die Synthese einer Komplementkomponente ganz ausfallen, andererseits kann ein Gen durch Mutationen so verändert sein, daß das synthetisierte Protein in der Aktivierungskaskade nicht funktioniert. Das gilt auch für die Erbanlagen der Inhibitoren, denn ein Inhibitormangel kann zu einer unkontrollierten

Komplementaktivierung und damit indirekt zu einem sekundären Mangel der entsprechenden Komplementkomponente führen (42).

4. Klinische Bedeutung des Komplements

Es ist bekannt, daß Komplement (C) als bedeutender Faktor bei den zellulären und humoralen Immunreaktionen mitwirkt. Die Komplementreaktion im Serum kann daher als Indikator für ablaufende immunologische Reaktionen betrachtet werden. In zunehmendem Maße wird heute bei der Untersuchung der Ursachen und des Verlaufs vieler Erkrankungen eine primäre oder sekundäre Beteiligung des Komplements in Betracht gezogen. Die Komplementkonzentration im Serum wird von vielen Faktoren beeinflußt. Der Spiegel des gesamten Komplements oder einzelner Komponenten im Serum kann daher erhöht oder erniedrigt sein. Eine Erniedrigung kann durch gesteigerten C-Verbrauch infolge einer Bindung an Antigen-Antikörper-Komplexe (z.B. bei Glomerulonephritis) durch verminderte Syntheserate der verschiedenen C-produzierenden Zellen oder durch vermehrte Aktivierung, z.B. bei Serumkrankheiten, Lupus erythematodes, hämolytische Anämie oder chronische Polyarthritis u.a., verursacht werden.

Die Ursachen einer Erhöhung von C sind noch nicht ganz geklärt; es wird angenommen, daß eine Überproduktion vorliegt (26). Eine Erhöhung kann bei akutem rheumatischem Fieber, Colitis ulcerosa, einigen akuten Infektionskrankheiten sowie bei Verletzungen und Verbrennungen auftreten (109).

5. Die dritte Komplementkomponente C3

Die dritte Komplementkomponente (C3) nimmt im Abwehrsystem eine zentrale Stellung ein und ist als die wichtigste Komplementkomponente zu betrachten (7; 13; 15; 30; 32; 66; 118; 158; 160). C3 besteht aus zwei Polypeptidketten: der α-Kette mit einem Molekulargewicht von 100.000 - 120.000 Dalton und der ß-Kette mit einem Molekulargewicht von 70.000 - 80.000 Dalton (62; 150; 160). C3 hat eine elektrophoretische Wanderungs-

geschwindigkeit im β1C-Globulin-Bereich (30). Im normalen menschlichen Serum hat C3 mit 50 bis 120 mg/100 ml die höchste Konzentration von allen Komplementkomponenten (6). C3 ist die Ausgangssubstanz einer ganzen Reihe physiologisch aktiver Fragmente.

Im Testmodell (Abb. 3) bei der Lyse von sensibilisierten Erythrozyten wird das native, ungebundene und funktionell inaktive C3-Substrat durch die C3-Konvertase enzymatisch in zwei Bruchstücke, C3a und C3b, gespalten (32; 160; 165).

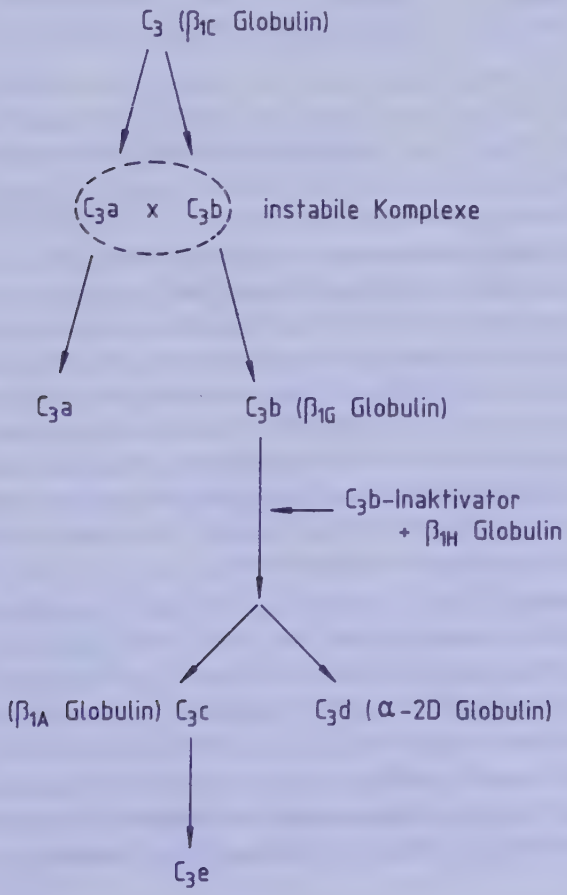

Abb. 3: Spaltprodukte der C3-Aktivierung und C3-Inaktivierung.

Diese beiden Bruchstücke liegen zunächst als Komplexe (C3a; C3b) mit geringer Bindungskonstante im Serum vor. Das kleine Bruchstück C3a, ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 7.000 Dalton, stellt einen wichtigen Entzündungsmediator dar. Die biologische Leistung von C3a ist vielseitig. C3a fördert die Histaminfreisetzung aus Mastzellen, was zur Kontraktion von glatten Muskelfasern und Steigerung der Vasopermeabilität bis zur Ödembildung führen kann (62). C3a setzt Serotonin aus Thrombozyten frei und wirkt gegenüber Tumorzellen, Mykoplasmen, Bakterien usw. zytotoxisch. Leukozyten, Monozyten und Makrophagen reagieren auf C3a chemotaktisch. Zusammen mit C5a wirkt es als extrem stark entzündungsauslösende Substanz (62).

Das größere C3-Bruchstück C3b, mit einem Molekulargewicht von ca. 185.000 Dalton, kann sich nach Bindung an einen Akzeptor am weiteren Ablauf der Aktivierungskaskade beteiligen, wobei zunächst C5 gespalten wird. Andererseits kann es sich an einer Membranoberfläche mit dem Faktor B verbinden und so den alternativen Aktivierungsgang einleiten; schließlich kann es durch den C3b-Inaktivator zu C3c und C3d gespalten werden. Das C3b spielt bei der Opsonisierung eine wichtige Rolle, denn es hat die Fähigkeit, sich an biologischen Membranen und vielen anderen Substanzen zu verankern. Mit C3b beladene Zellen oder andere Partikeln werden leicht von Makrophagen phagozytiert, und das ist möglicherweise für die Erregerabwehr von noch größerer Bedeutung als die Zellyse selbst, denn es sind Bakterienstämme bekannt, die durch Komplement nicht lysiert, aber opsonisiert werden können.

Das C3b-Molekül besitzt labile und stabile Bindungsstellen. Die labile Bindungsstelle reagiert mit C3b-Akzeptoren, die stabile mit C3b-spezifischen Rezeptoren. Die C3b-spezifischen Rezeptoren wurden auf Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten und Erythrozyten nachgewiesen (33; 150). Ebenso wie C3b reagiert auch dessen Spaltprodukt C3d mit spezifischen zellulären Komplementrezeptoren. Das Fragment C3c ist der Vorläufer von C3e, einem Fragment mit

kleinem Molekulargewicht, welches die Aktivierung der segmentkernigen Leukozyten hervorrufen kann (62).

Die Ergebnisse vieler Versuche sprechen dafür, daß die Leber der wichtigste, jedoch nicht der einzige Syntheseort des humanen C3 ist (117). Alper und Mitarbeiter (2) haben nach einer Transplantation der menschlichen Leber einen starken Abfall der C3-Konzentration und einen Wechsel des C3-Typs (FS 0,6) des Leberempfängers in dem C3-Typ (SS) des Spenders festgestellt. Weitere Untersuchungen stützen die Annahme, daß die Leberparenchymzellen C3 produzieren (24; 43; 67; 92). Ruddy und Colten konnten bei Patienten mit rheumatischer Arthritis aber auch eine extrahepatische C3-Synthese nachweisen (126).

6. Komplement-Bestimmungsmethoden

Funktionelle Tests

Das Komplement oder auch die einzelnen C-Komponenten können über ihre biologische Funktion oder als Proteine gemessen werden. Eine der bekanntesten Methoden zur Bestimmung der biologischen Aktivität des gesamten Komplements ist die im Jahre 1961 von Mayer (91) beschriebene Messung der hämolytischen Aktivität (CH 100, CH 50) im Serum. Am Ablauf der Immunhämolyse sind alle Komplementkomponenten, Inhibitoren und Aktivatoren beteiligt. Diese Methode wird heute in modifizierter Form (Quantiplatten) als Übersichtstest verwendet, um starke Abweichungen oder das Fehlen einzelner C-Komponenten zu entdecken (28). Eine weitere Meßmethode der funktionellen Aktivität des Komplements ist die radiale Immunhämolyse in Agar (CH 50). Hiermit bestimmt man die Serummenge, die für die Lyse von 50% der sensibilisierten Erythrozyten notwendig ist (Quantiplatte Kallestad).

Die biologische Aktivität des Komplementsystems kann unter Benutzung der Chemotaxis, der Phagozytose-Beschleunigung oder der Immunadhärenz gemessen werden (67). Diese Tests sind je-

doch sehr aufwendig und werden daher in der Routinediagnostik nicht verwendet.

Rapp und Borsos beschrieben die Molekulartitration zur Bestimmung der Aktivität (pro ml Serum) von C1, C4 und von Molekülen einer untersuchten Komponente, die zur Lyse von Zellen führt (108). Voraussetzung für diese Methode sind optimale Reaktionsbedingungen. Hierbei soll die zu bestimmende Komponente den limitierenden Faktor darstellen, und daher müssen alle anderen Komponenten im Überschuß vorhanden sein. Diese Methode liefert die am besten reproduzierbaren Ergebnisse (108; 124). Mit Hilfe der Titerbestimmung auf Mikroplatten oder in Reagenzgläsern kann man die Aktivität der einzelnen Komplementkomponenten bestimmen (28). Zur Ausführung dieser Methode müssen alle Komplementkomponenten in gereinigter Form vorliegen; dadurch kann dieser aufwendige Test nur in speziell darauf eingestellten Laboratorien durchgeführt werden. Selbstverständlich kann man funktionelle Tests nur in frischen Seren durchführen.

Die funktionellen Tests sind häufig aussagekräftiger als die Ergebnisse proteinchemischer Methoden; diese Methoden sind jedoch so stark vereinfacht und standardisiert worden, daß sie heute in der Forschung und in der Routinediagnostik überwiegend verwendet werden.

Proteinchemische Tests

Alle C-Komponenten sind Proteine und können daher in proteinchemischen Tests gemessen werden. Zur quantitativen Bestimmung einzelner C-Komponenten wird die im Jahre 1965 von Mancini beschriebene radiale Immundiffusion (RID) angewendet. Hierzu benutzt man Antikörper, die mit jeweils einer Komponente spezifisch reagieren. Die im Agargel entstandenen Präzipitationsringe zwischen Antigenen und Antikörpern können quantitativ ausgewertet werden (85). Die zur Zeit vielfach verwendeten quantitativen ein- und zweidimensionalen Immunelektrophoresetechniken sind Modifikationen eines Verfahrens, das 1965 von Laurell beschrieben worden ist. Das Prinzip der Me-

thode ist die elektrophoretische Wanderung von Antigenen in einem antikörperhaltigen Gel, wobei zwischen den Antigenen und spezifischen Antikörpern eine Immunpräzipitation stattfindet. Die Fläche des Präzipitates ist proportional zu der Antigenkonzentration und zum reziproken Wert des Antikörpertiters (82). So funktionieren die eindimensionale "rocket"-, "fused rocket"- und Linien-Immunelektrophorese.

Immer häufiger wird die Bestimmung von C-Komponenten (z.B. C3) in flüssigen Medien mit Hilfe der Laser-Nephelometrie durchgeführt (18; 31). Die durch Zugabe von spezifischem Antiserum gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe verursachen eine Trübung des Serums, die durch Messung der Lichtstreuung des Laserstrahls quantitativ erfaßt wird (Hyland, Behring-Werke).

Um zusätzliche Informationen über eine in vivo stattgefundene Komplementaktivierung zu erhalten, wird die zweidimensionale, quantitative Immunelektrophorese nach Laurell verwendet. Diese Technik ist eine Kombination der normalen Elektrophorese in der ersten Dimension und einer Immunelektrophorese in der zweiten Dimension, die rechtwinklig zu der ersten durchgeführt wird (10; 104). Hierbei kann man u.a. den Übergang von C3 (β1C-Globulin) in C3c (β1A-Globulin) während der Serumalterung prüfen, da sich die Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden C3-Formen im elektrischen Feld unterscheiden. Eine wesentliche Ergänzung der Komplement-Bestimmungsmethoden ist die Immunfluoreszenztechnik. Hierbei kann man mit Hilfe von markierten Antiseren komplementbindende Komplexe im Gewebe qualitativ bzw. semiquantitativ erfassen.

II. Problemstellung der eigenen Untersuchungen

Da das C3b als aktives Spaltprodukt der C3-Aktivierung eine wichtige Rolle in der humoralen Abwehr einnimmt, ist die quantitative Bestimmung dieses Proteins von großer Bedeutung. Bisher ist keine Methode zum quantitativen Nachweis von C3b bekannt.

1. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik eine Methode zur quantitativen Bestimmung von C3b aufzubauen.

2. Zur Überprüfung einer solchen Methode sollten die damit gemessenen C3b-Werte mit den in denselben Seren bestimmten C3c-Werten verglichen werden, denn die C3c-Konzentration kann mit einer bewährten, standardisierten Methode, der radialen Immundiffusion nach Mancini (85), auf M-Partigen-Platten ermittelt werden.

3. Weiterhin sollte die Anwendbarkeit der neuen Methode bei der Untersuchung von mehreren größeren Personenkollektiven getestet werden.

III. Material und Methoden

1.1 Versuchstiere

Folgende Versuchstiere wurden verwendet:

a) weiße weibliche Wistar-Ratten (Zucht Ivanovas, Kißlegg/Allgäu) mit einem Gewicht von 200 bis 250 g. Die Haltung erfolgte unter konventionellen Bedingungen mit Standardfutter der Firma Intermast und Wasser ad libitum.
b) Kaninchen, und zwar bunte Kreuzungstiere mit einem Körpergewicht von ca. 3 kg (Züchter: J. Schmitz, Krefeld). Bei konventioneller Haltung erhielten die Tiere Standardfutter Lk 01 der Firma Hope Frams N.V. (Woerden, Holland).

1.2 Humanseren als Komplementquelle

Zur Bestimmung der C3c- bzw. C3b-Konzentration wurden Seren von folgenden Personen verwendet:

a) Von 349 weiblichen und männlichen Personen, die im Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf auf Tropentauglichkeit untersucht wurden und ohne krankhafte Befunde waren;
b) von 424 gesunden Frauen im Verlauf einer normalen Schwangerschaft, die zur Kontrolluntersuchung in die Frauenklinik der Universität Düsseldorf gekommen waren;
c) von 362 gesunden 60jährigen Männern aus Duisburg und 294 aus Gummersbach, die im Rahmen der epidemiologischen Studie WIKA 1977 untersucht wurden.

Die Blutproben wurden ohne Zusatz von gerinnungshemmenden Mitteln kaltgestellt (0-4°C) und nach zwölf Stunden bei 3.000 U/min. zentrifugiert. Hämolytische und lipämische Seren wurden verworfen. Alle Seren wurden im Versuch mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, und zwar für den Immunfluoreszenztest im Verhältnis 1:8 und für die RID im Verhältnis 1:2.

1.3 Konjugate von Antiseren

In dem Immunfluoreszenztest wurden folgende mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierte Antisera verwendet:

1. Anti-Human C3 (β1C/β1A-Globulin) Serum von der Ziege; Firma Hyland, Division Travenol Lab., Costa Mesa Calif.(USA):
   gesamte Proteinkonzentration (P) = 9,2 mg/ml
   Antikörper-Konzentration (Ab) = 1,7 mg/ml
2. Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege (IgG-Fraktion); Fa. Cappel Laboratories, Div. Cochranville, Pa. (USA):
   gesamte Proteinkonzentration (P) = 19,4 mg/ml
   Antikörper-Konzentration (Ab) = 8,0 mg/ml
3. Anti-Kaninchen-IgM von der Ziege; Fa. Cappel (s.o.):
   (Über P und Ab wurden hier keine Angaben gemacht.)
4. Anti-Ziege-IgG vom Kaninchen (IgG-Fraktion); Fa. Cappel (s.o.):
   gesamte Proteinkonzentration (P) = 10,9 mg/ml
   Antikörper-Konzentration (Ab) = 5,0 mg/ml

Die gefriergetrockneten Antiseren wurden bei ca. 4°C gelagert, vor dem Verbrauch mit Aqua dest. bzw. Puffer aufgelöst und in kleinen Portionen bei -70°C aufbewahrt. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Antiseren wurde vermieden.

1.4 Radiale Immundiffusion (RID) zum Nachweis von C3c

Als Vergleichstest zu der C3c-Bestimmung mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode wurde die radiale Immundiffusion zur C3c-Bestimmung nach Mancini (85) durchgeführt. Hierzu wurden M-Partigen-Platten der Behring-Werke Marburg benutzt. Zur quantitativen Überprüfung der Methode wurde Protein-Standard Serum B, Serum 1 (30 mg C3c/100 ml), Serum 2 (60 mg C3c/100 ml) und Serum 3 (120 mg C3c/100 ml) der Berhring-Werke verwendet. Die Platten enthalten in einer gebrauchsfertigen Agargelschicht monospezifisches Antiserum gegen C3c (β1A-Globulin). Die Auftragsstellen 1 bis 3 der Platte wurden mit Hilfe des Capilletors mit 5 µl des Protein-Standard-Serums B beschickt und die

übrigen Auftragsstellen 4 bis 12 mit 5 µl Humanserum in einer Verdünnung 1:2 mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt (Abb. 4).

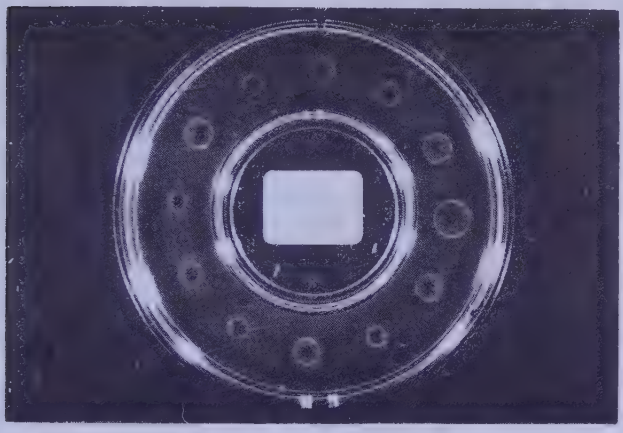

Abb. 4: M-Partigen-Immundifussionsplatte zur Bestimmung von C3c-Konzentrationen nach 72 Stunden. Die Auftragsstellen 1-3 wurden mit dem Protein-Standard B, die übrigen jeweils mit Humanseren beschickt.

Nach dem Beschicken blieben die Platten bei Raumtemperatur verschlossen stehen. Nach drei Tagen wurde der Durchmesser der entstandenen Präzipitationsringe auf 0,1 mm genau mit dem Partigen-Meßprojektor gemessen. Eine Bezugskurve aus dem quadrierten Ringdurchmesser der drei mit Protein-Standard-Serum B erhaltenen Präzipitate und mit Standard-Serum enthaltenen mg/ml C3c wurde hergestellt. Die Fläche der mit Standard-Seren erhaltenen Präzipitationsringe und daher auch das Quadrat ihrer Durchmesser ist jeweils der Serumkonzentration an C3c proportional. Der Meßbereich der Platten reicht von 9,5 bis 132 mg/ml. Die Fehlerbreite dieser Methode liegt unter 10% (129).

1.5 Herstellung des nephrotoxischen Antiserums

Zur Induktion der Antikörperbildung gegen Rattennieren wurden Kaninchen mit einem Homogenat aus Rattennieren immunisiert (Abb. 5).

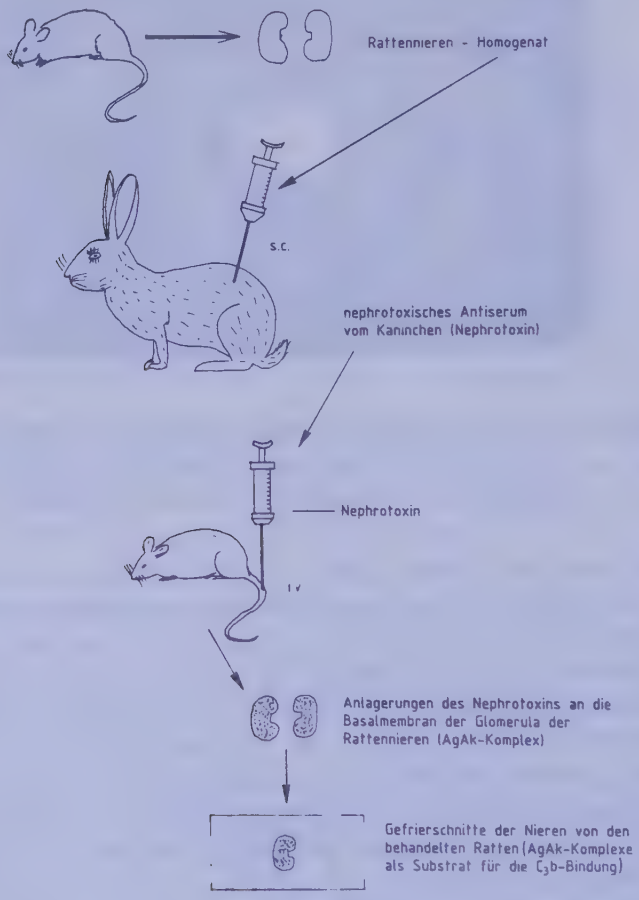

Abb. 5: Schematische Darstellung der Herstellung von Nephrotoxin und anschließende Nephrotoxin-Behandlung von Ratten zur Gewinnung eines Substrates (AgAk-Komplex) für die C3b-Bindung.

Das Homogenat wurde aus Nieren von gesunden, weiblichen Wistar-Ratten gewonnen. Die Nieren wurden mit physiologischer Kochsalzlösung durch die Arteria renalis blutfrei gespült. Nach der Entnahme wurden die Nieren mit dem Ultra Turrax (Typ TP 18-10 20.000 U/min.) homogenisiert. Um die Antikörperbildung zu verstärken, wurde 1 ml Rattennieren-Homogenat mit 1 ml komplettem Freund'schem Adjuvans (1 ml Bayol, 1 ml Falba und 2,2 mg abgetötetem Mycobakterium tuberculosis) versetzt. Zur Immunisierung wurden sechs Bastardkaninchen verwendet, da sich reinrassige Neuseeländer Kaninchen wegen ihrer Anfälligkeit gegen Infektionen für diese Immunisierung als nicht geeignet erwiesen haben. Zu Beginn der Immunisierung erhielt jedes Tier dreimal in wöchentlichem Abstand je 5 ml des Homogenat-Adjuvans-Gemisches an mehreren Stellen intracutan injiziert. Die Tiere wurde weitere drei Wochen beobachtet. Darauf folgten noch drei Injektionen von 5 ml Homogenat + Adjuvans in wöchentlichem Abstand. Zwei Wochen nach der letzten Injektion erhielt jedes Tier als Booster-Injektion 5 ml reines Rattennieren-Homogenat ohne Freund'sches Adjuvans intramuskulär. Eine Woche nach der Booster-Injektion wurde durch Herzpunktion Blut entnommen und im Ouchterlony-Test der Antikörpertiter bestimmt (65). Wenn der Titer entsprechend höher als 1:1.000 lag, wurden die Tiere in Epantolnarkose entblutet. Das Blut blieb 30 min. bei Zimmertemperatur stehen und wurde anschließend mit 3.000 U/min. zentrifugiert. Um die Antikörper, die gegen Rattengewebe gerichtet sind, aber nicht spezifisch auf das Nierengewebe der Ratten reagieren, aus dem Antiserum zu entfernen, wurde das Kaninchen-Serum mit Rattenleberpulver abgesättigt (100 mg/ml) und nochmals 30 min. bei 20.000 U/min. (Zentrifuge Servall RC2-B-Rotor SM-24) zentrifugiert. Zur Inaktivierung des Kaninchen-Komplements wurden die Seren 30 min. lang in einem Wasserbad auf 56°C erwärmt. Danach wurde das Antiserum in 2 ml-Ampullen abgefüllt, versiegelt und bei -70°C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurde das Antiserum nochmals 10 min. bei 56°C inaktiviert.

1.6 Rattennierengewebe als Substrat für die C3b-Bindung

Als AgAk-Komplex, an den sich das aktive Spaltprodukt C3b binden kann, diente das an die Basalmembran der Glomerula gebundene Nephrotoxin. Um eine solche Bindung an die Basalmembran von Glomerula zu induzieren, wurde gesunden Wistar-Ratten je 1,0 ml inaktiviertes nephrotoxisches Antiserum vom Kaninchen in die Schwanzvene injiziert, während den Kontrolltieren je 1,0 ml normales, inaktiviertes Kaninchenserum und anderen Tieren 1,0 ml physiologische Kochsalzlösung intravenös injiziert wurde. Als weitere Kontrollgruppe dienten unbehandelte Wistar-Ratten mit gleichem Gewicht aus derselben Züchtung.

Schlipköter und de Ruiter (132) haben im Jahre 1970 festgestellt, daß die Bindung von Nephrotoxin in den Glomerula der Rattenniere in einem Zeitraum zwischen zwei und sechs Stunden nach der Injektion zu einem Maximum ansteigt und bis 34 bzw. 39 Tage mit FITC-markiertem Anti-Kaninchen-Serum nachweisbar ist. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Ratten daher drei Stunden nach der Injektion mit Äther getötet. Nach Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Rattennieren im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt. Mit Hilfe des Kryostat-Mikrotoms (nach Pearse Typ HS der Firma SLEE, London) wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt, die bis zur Weiterbearbeitung unfixiert im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt werden konnten.

1.7 Methode der Anti-Komplement-Immunfluoreszenz

In Abbildung 6 ist schematisch die Behandlung der Rattennierenschnitte für die C3b-Bestimmung mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik dargestellt. Die unfixierten Nierenschnitte der mit Nephrotoxin behandelten Ratte wurden 30 min. in Veronal-Puffer pH 7,4 nach Osler-Strauss-Mayer (53) gewässert. Danach wurden die Präparate mit verdünntem Humanserum als Komplementquelle beschichtet und 30 min. in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Durch mehrfaches, gründliches Spülen wurde das

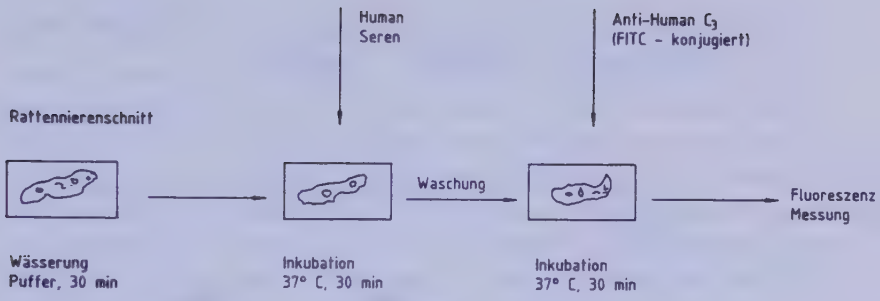

Abb. 6: Schematische Darstellung der Behandlung von Rattennierenschnitten für die C3b-Bestimmung mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik.

nicht gebundene Komplement entfernt. Dann wurden die Präparate mit FITC-konjugiertem Anti-Human-C3 (B1C/B1A-Globulin), in Verdünnung 1:8, mit inaktiviertem Rattenserum überschichtet. Danach wurden die Präparate 30 min. in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und durch anschließende Spülung von nicht gebundenem Antiserum befreit. Nach weiterer 60minütiger Wässerung in Puffer wurden die Präparate fluoreszenzoptisch ausgewertet.

Zum Ausschluß der unspezifischen Fluoreszenz dienten folgende Ansätze:

a) Inkubation von Schnitten der gleichen Rattenniere mit hitze-

inaktivierten Humanseren statt des aktiven Humanserums,

b) Nierenschnitte von Ratten, welchen 1,0 ml normales Kaninchenserum bzw. 1,0 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert worden war,

c) Nierenschnitte von unbehandelten Ratten.

Das Prinzip der immunologischen Reaktion zur C3b-Bestimmung ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

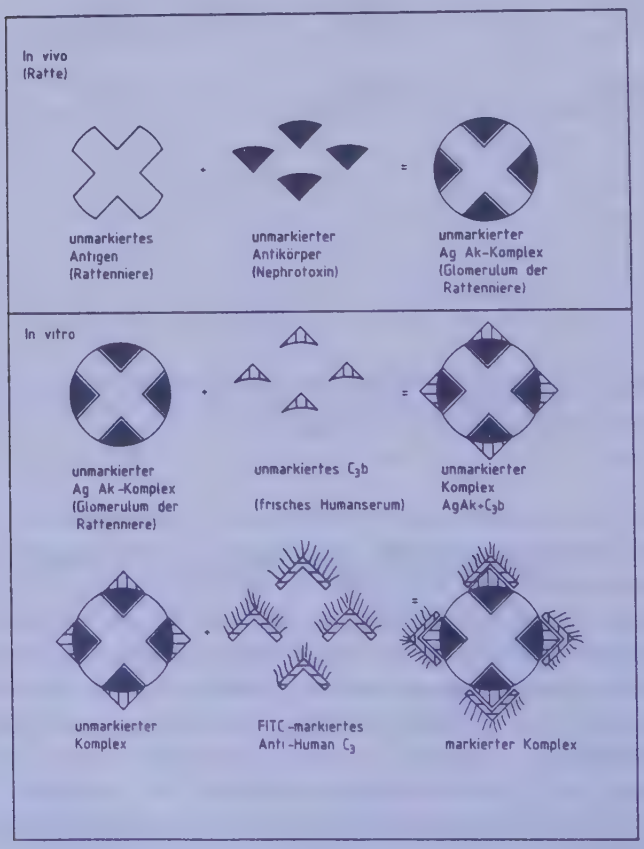

Abb. 7: Schematische Darstellung des Modells zur C3b-Bestimmung im menschlichen Serum mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik.

In vivo sind bei der Ratte nach Injektion von Nephrotoxin die Antikörper an die Basalmembranen der Nieren gebunden. Der AgAk-Komplex im Nierenschnitt wird als Substrat für das C3b verwendet. Es ist bekannt, daß das gesamte C3-Molekül im Serum in nativer, bindungsunfähiger Form als ßlC-Globulin vorliegt. Infolge der Aktivierung wird C3 in zwei Bruchstücke gespalten: in C3a und C3b, wobei sich C3b an AgAk-Komplexe binden kann. Diese Bindung vollzog sich in unserem Versuchsmodell in vitro, wobei sich C3b aus menschlichem Serum an den AgAk-Komplex im Rattennierenschnitt bindet. Um diesen Komplex aus AgAk und C3b quantitativ zu erfassen, wurden die Schnitte mit FITC-markiertem Anti-Human C3 nochmals bei 37°C inkubiert. Dabei entsteht ein FITC-markierter Komplex aus AgAkC3b und Anti C3, dessen Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Photometers bestimmt werden kann.

1.8 Optisches System und Messung der Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität (FI) in den Rattennierenschnitten wurde im Auflichtverfahren unter Anwendung der Selektivanregung des FITC mit Hilfe des Mikroskop-Photometers der Fa. Leitz gemessen (Abb. 8).

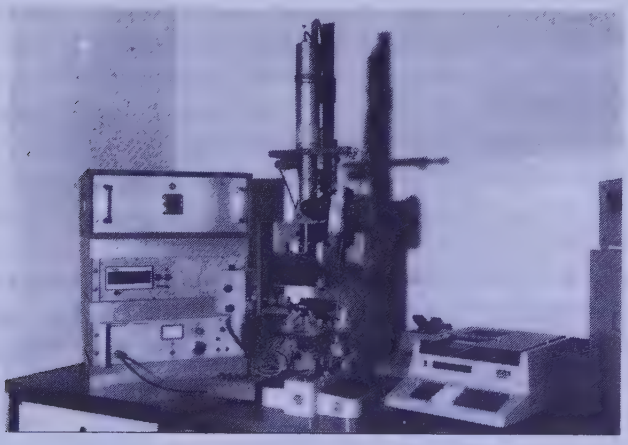

Abb. 8: Mikroskop-Photometer mit Registrier- und Auswerteeinrichtung, angewandt bei der C3b-Bestimmung.

Das Mikroskop war folgendermaßen ausgestattet: Objektiv Apo 25/200/0,55; Meßblende rund, feststellbar, zentrierbar; Meßfeld 80 µm Ø (einstellbar); Lichtquelle, Xenon Höchstdrucklampe - XBO - 75 W/2; Leitz Filtersystem I2: Erregerfilter 480 µm; Wärmeschutzfilter KG1; Rotdämpfungsfilter, Glasfarbfilter BG 38; Sperrfilter, Kantenfilter 510; Auflichtkondensor IIE mit Reflektor Fl 500 bzw. 490, Photometeraufsatz 01 und Photo-Multiplier Typ 9558 AS/N 20755. Hierzu kamen die Registrier- und Auswerteeinrichtungen; Meßverstärker Typ NSHN BN 600 S/N 655, digitale Zifferanzeigeeinheit VI 300 - Schneider Electronique, Dilektor "Diehl" und programmierte Lochstreifen, Tischrechner "Algotronic" der Firma Diehl.

Alle möglichen Fehlerquellen des optischen Systems, wie etwa Filterstellung, Meßfeld usw., wurden vor der FI-Messung täglich überprüft. Die Optik und die elektronische Auswerteeinrichtung des Mikroskops wurden mit Hilfe von FITC-Standard-Uranyl auf den "0"-Wert eingestellt. Der Abfall der Leistung der Xenon-Lampe konnte durch den Austausch der Lampe nach einer Betriebszeit von 400 Stunden vermieden werden (Brenndauer lt. Fa. Leitz = 800 Stunden). Die Fluoreszenzintensität der Gewebeschnitte wurde nach folgendem Verfahren bestimmt: Die Intensität der spezifischen Fluoreszenz wurde in den Glomerula der Nierenschnitte gemessen. Die Anzeige der Fluoreszenzintensität erfolgte in relativen Spannungsschritten (V) und wurde am Digitalanzeiger abgelesen und in einen Tischrechner übertragen. Um die Zuverlässigkeit des Mittelwertes zu erhöhen, wurde die Fluoreszenzintensität von jeweils 20 Glomerula pro Schnitt gemessen. Neben den Glomerula zeigte das übrige Gewebe der Nierenrinde eine verhältnismäßig schwache unspezifische Fluoreszenz. Da diese jedoch bei Verwendung des gleichen Humanserums in den einzelnen Schnitten unterschiedlich war und sich proportional mit der Fluoreszenz der Glomerula veränderte, mußte sie in jedem Schnitt einzeln berücksichtigt werden. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich die FI von 20 Stellen des Rindengewebes gemessen. Aus jeweils 20 Meßwerten wurde der Mittel-

wert mit Standardabweichung getrennt für Glomerula und Rindengewebe eines Rattennierenschnittes berechnet. Aus den Meßwerten der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität der Glomerula und des Rindengewebes wurde die relative Fluoreszenzintensität (QFI) der Glomerula nach der Formel berechnet:

$$QFI = \frac{FI\ Glomerula \quad (\bar{x})}{FI\ Rindengewebe\ (\bar{x})}$$

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computers DEC System 10 durchgeführt.

IV. Ergebnisse

Quantitative C3b-Bestimmung mit Hilfe fluoreszenzserologischer Messungen an histologischen Schnitten

Um das aktive Spaltprodukt des C3, das C3b, quantitativ bestimmen zu können, muß man es mit einem Antigen-Antikörper-Komplex zusammenbringen, an den sich C3b binden kann. Hierzu diente als Antikörperquelle das nephrotoxische Antiserum und Antigene der Basalmembranen der Glomerula in der Rattenniere. Voraussetzung für die praktische Verwendbarkeit einer neuen Methode sind gut reproduzierbare Ergebnisse. Dazu muß man alle denkbaren Fehlerquellen weitgehend ausschalten. Die C3b-Bestimmung mit der Immunfluoreszenztechnik wurde daher unter verschiedenen Bedingungen kritisch überprüft.

1. Eigenschaften des Substrates zur C3b-Bindung

1.1 Vorkommen von spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexen

Nach Injektion von Nephrotoxin kommt es bei Versuchstieren zur Entwicklung einer experimentellen Glomerulonephritis. In der Frühphase der Glomerulonephritis, bevor lichtoptisch pathologische Veränderungen der Glomerula diagnostiziert werden können, werden innerhalb der Glomerulakapillaren, vorwiegend an den Basalmembranen, Immunglobuline abgelagert und Antigen-

Antikörper-Komplexe gebildet (90). Die AgAk-Komplexe im Glomerulum der Rattenniere wurden als Substrat für die Anlagerung von C3b ausgewählt. Diese AgAk-Komplexe in Nierenschnitten der mit Nephrotoxin behandelten Ratte wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmethode nachgewiesen (Abb. 9).

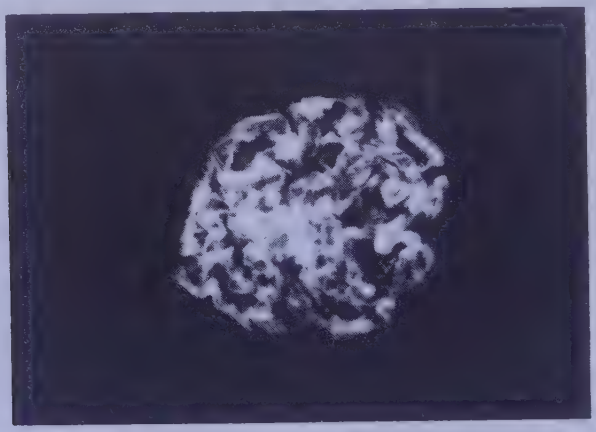

Abb. 9: Fluoreszenzoptische Aufnahme eines Glomerulums im Nierenschnitt einer mit Nephrotoxin injizierten Ratte, inkubiert mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen-γ-Globulin von der Ziege.

Zum Nachweis, daß sich nach der Injektion von Nephrotoxin tatsächlich spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet haben, wurden Nierenschnitte von Ratten nach i.v. Injektion von 1 ml Nephrotoxin, von 1 ml physiologischer Kochsalzlösung bzw. 1 ml normalem Kaninchenserum und von unbehandelten Ratten mit der Immunfluoreszenztechnik getestet. Die Nierenschnitte von 24 unterschiedlich behandelten Ratten wurden mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen-γ-Globulin inkubiert und die Fluoreszenzintensität (FI) mit Hilfe des Mikroskop-Photometers gemessen.

Die Ergebnisse der FI-Bestimmung sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Ratte Nr.	Nephrotoxin FI			Physiol. Kochsalz-Lösung FI			Normales Kaninchen Serum FI			unbehandelt FI		
	Glom.	Gew.	QFI	Glom.	Gew.	QFI	Glom.	Gew.	QFI	Glom.	Gew.	QFI
1	15,63	1,04	14,96	0,73	0,85	0,86	1,01	1,03	0,98	0,98	1,02	0,96
2	15,00	0,89	16,94	1,01	1,00	1,01	0,93	0,97	0,96	0,87	0,89	0,98
3	13,60	0,87	15,58	0,95	0,96	0,99	0,84	0,91	0,92	1,02	1,05	0,70
4	16,02	1,04	15,46	0,79	0,83	0,95	0,87	0,93	0,94	0,77	0,93	0,83
5	15,98	0,85	18,80	0,88	0,94	0,94	1,00	0,99	1,01	0,95	0,94	1,01
6	15,72	0,86	18,28	0,74	0,81	0,91	0,79	0,84	0,94	0,86	0,95	0,91
$\bar{X}$	15,32	0,93	16,67	0,85	0,90	0,94	0,91	0,95	0,96	0,91	0,96	0,90
$S\bar{x}$	0,92	0,10	1,46	0,10	0,10	0,05	0,10	0,00	0,03	0,10	0,00	0,12

Tab. 3: Fluoreszenzintensität (FI) in Glomerula (Glom.), im Rindengewebe (Gew.) und relative Fluoreszenzintensität (QFI) in Nierenschnitten von Ratten nach i.v. Injektion von Nephrotoxin, physiologischer Kochsalzlösung und normalem Kaninchenserum sowie von unbehandelten Ratten.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, wurde in den Glomerula der Nierenschnitte von Ratten, die mit Nephrotoxin injiziert worden waren, eine Fluoreszenz zwischen 13,60 und 16,02 ($\bar{X}$ = 15,32 $S\bar{x}$ = 0,92) gemessen, der Quotient QFI betrug im Mittel $\bar{X}$ (QFI) = 16,67.

In den Gruppen von jeweils 6 Ratten, die mit physiologischer

Kochsalzlösung und normalem Kaninchenserum behandelt worden waren, wurde keine spezifische Fluoreszenz in den Glomerula festgestellt; die unspezifische Anfärbung lag, ebenso wie im Rindengewebe, bei Werten zwischen 0,85 und 0,95 relativen Spannungseinheiten ($\bar{X}$ QFI = 0,94 bzw. 0,96). Auch in Glomerula der unbehandelten Ratten wurde keine spezifische Fluoreszenz nachgewiesen ($\bar{X}$ QFI = 0,90).

1.2 Klassifikation der Antikörper des AgAk-Komplexes

Nachdem festgestellt worden war, daß nach Injektion von Nephrotoxin AgAk-Komplexe in den Glomerula der Rattenniere vorhanden sind, stellte sich die Frage, welcher Immunglobulinklasse diese Antikörper angehören.

Die Klassifikation der Antikörper erfolgte mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Zum Nachweis von IgG-Ablagerungen wurden die Rattennierenschnitte mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege inkubiert; dabei wurde eine deutliche spezifische Fluoreszenz in den Glomerula der Rattennieren festgestellt. Als Kontrolle dienten Nierenschnitte von unbehandelten Tieren.

Mit der Immunfluoreszenzreaktion ließen sich auch Antikörper der Klasse IgM nachweisen. Nach Inkubation mit Anti-Kaninchen-IgM von der Ziege wurden die Nierenschnitte mit FITC-konjugiertem Anti-Ziege-IgG vom Kaninchen erneut inkubiert. In den Glomerula so behandelter Nierenschnitte wurde eine Fluoreszenz gemessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Nach einer Behandlung der Rattennierenschnitte mit FITC-konjugiertem Kaninchen-γ-Globulin wurde eine Fluoreszenz, die im Mittel bei $\bar{X}$ QFI = 35,05 lag, gemessen. In den Nierenschnitten der nicht mit Nephrotoxin injizierten Ratten ließ sich in den Kontrollversuchen keine spezifische Fluoreszenz (QFI = 0,97 bzw. 0,99) nachweisen (Tab. 4). Nach Inkubation der Nierenschnitte mit Anti-Kaninchen-IgG betrug die relative Fluoreszenz $\bar{X}$ QFI = 18,90 und bei Anti-Kaninchen-IgM $\bar{X}$ QFI = 5,16.

		Behandlung mit FITC-konjugierten Antiseren:		
Ratten-Niere	Nieren-Exstirpation	Anti-Kan.-γ-Globulin	Anti-Kan.-IgG	Anti-Kan.-IgM
R-K-N 83/1 (Kontrolle)		0,99	0,91	0,87
R-K-N 83/2		0,97	0,92	0,73
R-G-N 83/1I	10. Tag	48,00	16,94	8,03
1II		35,93	20,87	5,19
R-G-N 83/2I	21. Tag	40,56	19,55	4,27
2II		43,12	15,19	4,76
R-G-N 83/3I	21. Tag	29,52	16,53	5,74
3II		29,68	18,32	4,87
R-G-N 83/4I	31. Tag	34,46	18,80	4,08
4II		19,43	17,13	3,90
R-G-N 83/5I	31. Tag	36,58	19,43	5,49
5II		33,25	26,21	5,26
$S_{\bar{x}}$		7,89	3,07	1,18
$\bar{X}$		35,05	18,90	5,16

Tab. 4: Relative Fluoreszenzintensität (QFI) in Glomerula von mit Nephrotoxin behandelten und unbehandelten Ratten nach Inkubation der Schnitte mit folgenden FITC-konjugierten Antiseren: Anti-Kaninchen-γ-Globulin, Anti-Kaninchen-IgG, Anti-Kaninchen-IgM.

Die berichteten eigenen Befunde bestätigen die Angaben von Masugi (90), daß sich nach Injektion von Nephrotoxin in den Nieren IgG- und IgM-Ablagerungen bilden. Die Immunglobuline, sowohl der IgG- als auch der IgM-Klasse, besitzen die Fähigkeit,

Komplement zu binden und zu aktivieren (12; 13; 26; 30; 54; 55).

Um eine C3b-Bestimmung in einer größeren Anzahl von Seren durchführen zu können, ist es erforderlich, gleiche Rattennierenschnitte, mit Bezug auf die Menge des gebundenen Nephrotoxins, zu verwenden. Da man aus einer Rattenniere eine große Anzahl von Gewebeschnitten herstellen kann, sollte die Möglichkeit einer Lagerung der Schnitte getestet werden, bei der die Eigenschaften des AgAk-Komplexes in der Niere unverändert bleiben.

1.3 Stabilität des AgAk-Komplexes in den Rattennierenschnitten

Um die Stabilität des AgAk-Komplexes in den Glomerula der Rattennierenschnitte zu untersuchen, wurden die Gefrierschnitte nach verschiedenen Lagerungszeiten bei -70°C mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen-γ-Globulin inkubiert und die QFI-Werte bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung veranschaulicht Abbildung 10.

Im frischen Gefrierschnitt, also ein Tag nach der Injektion von Nephrotoxin, ist die Fluoreszenz der Glomerula sehr hoch, ebenso ist aber auch die unspezifische Fluoreszenz des Rindengewebes erhöht. Aus diesem Grund ist der errechnete Quotient (QFI) niedrig. Nach einem Monat Lagerung der Nierenschnitte in -70°C wurde bei 3 (N74/4, N82/12 und N82/13) der 7 untersuchten Nieren ein Abfall der unspezifischen Fluoreszenz des Rindengewebes gemessen und dadurch stieg der QFI an (Abb. 10). Bei den weiteren 4 Nieren (N82/7, N82/10, N82/11 und N74/3) konnte in der gleichen Zeit ein Abfall der Fluoreszenz in Glomerula und somit der QFI und erst nach 2 Monaten ein Anstieg festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde liegt in der anfänglichen Mitbeteiligung des ratteneigenen Komplementes an der unspezifischen Immunreaktion. Durch längere Lagerung der Schnitte bei -70°C wird das Komplement der Ratte funktionell inaktiviert und damit die unspezifische Reaktion stark reduziert. Die Reaktivität des AgAk-Komplexes in den Glomerula bleibt zwar bei einer Lagerung von -70°C in einigen Nieren noch bis 24 Monate vorhanden, aber die Nierenschnitte sollten im Zeitraum von 1 Monat bis 4 Monaten untersucht werden,

denn in dieser Zeit liefern alle die in Abbildung 10 untersuchten Nieren ziemlich konstante QFI-Werte.

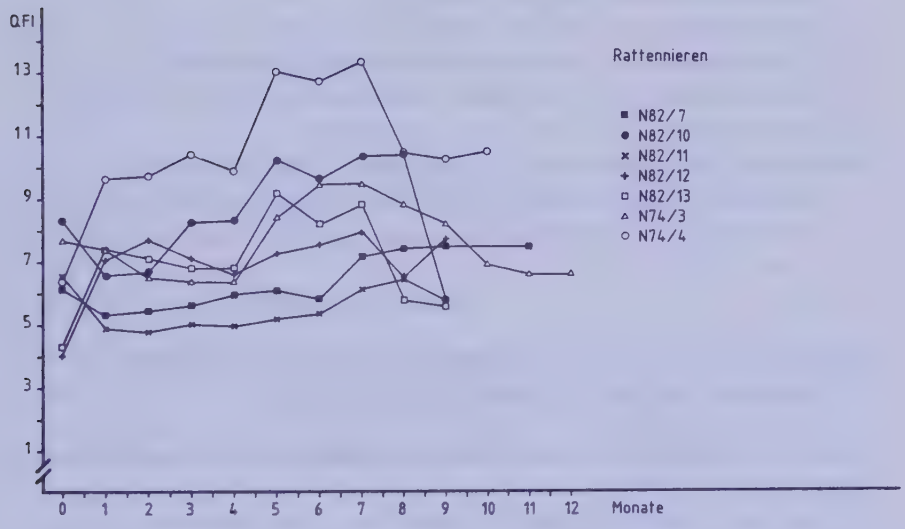

Abb. 10: Relative Fluoreszenzintensität (QFI) in Nierenschnitten von Ratten, die mit Nephrotoxin injiziert worden waren, nach Inkubation der Schnitte mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen-γ-Globulin. Abhängigkeit der QFI von der Lagerungszeit der Schnitte bei -70°C.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzintensität in den Nieren der einzelnen Ratten, obwohl für den Versuch Ratten mit gleichen Bedingungen wie Alter, Gewicht, Geschlecht, Haltung usw. verwendet wurden und eine konstante Dosis desselben Nephrotoxins injiziert wurde. Dieser Befund spricht für eine unterschiedliche Bindungsfähigkeit von Nephrotoxin und Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe im Glomerula der Rattennieren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen:

a) In Glomerula von Ratten sind nach Nephrotoxin-Injektion AgAk-Komplexe vorhanden, nicht aber bei den Kontrollen (Tab. 3).
b) Die in Glomerula abgelagerten Immunglobuline gehören den Klassen IgG und IgM an (Tab. 4).
c) Bei längerer Lagerung der Nieren in -70°C bleibt der AgAk-Komplex in Glomerula der Rattennieren stabil; nach ca. 6 Monaten ist ein Abfall der Fluoreszenzintensität zu erwarten.
d) Frisch hergestellte Nierenschnitte sollten wegen der anfänglich starken unspezifischen Reaktion des Rindengewebes nicht für die Immunfluoreszenzmethode verwendet werden (Abb. 10).

2. Einfluß von immunologischen und physikalisch-chemischen Faktoren auf die C3b-Bestimmung der Seren

Die Meßergebnisse und die Reproduzierbarkeit der Immunfluoreszenzmethode sind von immunologischen und physikalisch-chemischen Faktoren, u.a. von der Spezifität und Verdünnung des Konjugates, der Serumkonzentration sowie der Präparation und Lagerung der Seren, abhängig.

2.1 Abhängigkeit der Reaktion von der Verdünnung des Konjugates und des Humanserums

2.1.1 Spezifität des Konjugates

Bei Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik spielt die Spezifität und Empfindlichkeit des konjugierten Antiglobulins eine wichtige Rolle. Das Konjugat soll mit spezifischem Antigen, d.h. in der voeliegenden Arbeit mit an den AgAk-Komplex gebundenem C3b reagieren und dadurch eine spezifische Färbung in den Glomerula der Rattenniere erzeugen.
Wie die in Abschnitt 1.3 Ergebnisse zeigten, kommt es neben der spezifischen Immunreaktion in den Glomerula zu einer un-

spezifischen Anfärbung des Rindengewebes, die durch FITC-konjugierte Proteine oder freies FITC des Antiserums hervorgerufen werden kann.

Die Spezifität des in dieser Arbeit angewandten menschlichen Anti-C3 (von der Ziege - Fa. Hyland) konnte mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz in Seren, in denen C3b zerstört war, getestet werden. Hierzu wurden die - wie beschrieben - vorbehandelten Rattennierenschnitte und Humanseren, die entweder 7 Tage bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) gealtert oder 30 min. bei 56°C inaktiviert waren, inkubiert und anschließend mit FITC-konjugiertem Anti-Human C3 Serum behandelt. In beiden Fällen konnte eine spezifische Fluoreszenz in Glomerula nicht nachgewiesen werden.

2.1.2 Verdünnung des Konjugates

Im allgemeinen tritt eine nichtspezifische Anfärbung des Gewebes besonders bei Verwendung von unverdünntem bzw. niedrig verdünntem Antiserum auf. Aus diesem Grund war es wichtig für die C3b-Bestimmung, eine Konjugat-Verdünnung anzuwenden, bei der diese unspezifische Anfärbung verhindert oder stark reduziert wird.

Zur genaueren Prüfung der Spezifität des Konjugates wurden sowohl vom Konjugat als auch von frischem Humanserum Verdünnungen von 1:2 bis 1:128 angesetzt und die Abhängigkeit der QFI von den beiden Parametern in Form einer Schachbrett-Titration getestet (Tab. 5). Hierbei zeigte sich ein Abfall des QFI mit steigender Serum- und Konjugatverdünnung. In Rattennierenschnitten, die mit Mayer's Puffer und Humanserum (B) oder mit Mayer's Puffer und Konjugat ohne Humanseren (C) inkubiert wurden, konnte eine spezifische Fluoreszenz nicht festgestellt werden.

In Abbildung 11 ist die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenz QFI von der Verdünnung des Serums einerseits und der Verdünnung des Konjugates andererseits in einem dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt.

Konjugat (Anti Human C_3) Verdünnung	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1:128	B
Gesamtprotein-Konzentration 9,2 mg/ml	4.6	2.3	1.15	0.575	0.287	0.143	0.071	0
Spezifischer Antikörper-Konzentration 1,7 mg/ml	0.85	0.425	0.212	0.106	0.053	0.026	0.013	0
A) Humanserum-Verdünnung	QFI							
1: 2	4.55	4.46	4.34	3.29	2.03	1.24	1.13	1.16
1: 4	4.24	4.20	3.34	3.27	1.84	1.09	1.01	1.17
1: 8	4.38	4.44	3.46	2.92	1.42	1.14	1.06	1.18
1: 16	4.02	4.16	2.99	2.61	1.36	1.02	1.13	1.07
1: 32	3.29	4.02	3.01	2.31	1.30	1.18	1.05	1.05
1: 64	2.42	2.47	2.55	1.91	1.22	1.07	1.09	1.05
1:128	2.04	2.02	1.87	1.14	1.16	1.09	1.11	1.05
C)	1.15	1.12	1.20	1.14	1.06	1.22	1.10	

Tab. 5: Relative Fluoreszenzintensität (QFI) nach der Inkubation der Rattennierenschnitte mit
A) Humanserum und Konjugat* in Verdünnung 1:2 bis 1:128
B) Mayer's Puffer und Serum (1:2 bis 1:128) ohne Konjugat
C) Mayer's Puffer und Konjugat (1:2 bis 1:128) ohne Humanseren
* Konjugat = Anti-Human C3-FITC konjugiert

Aus dieser Darstellung wird ein optimaler Arbeitsbereich für das Konjugat zwischen den Verdünnungsstufen 1:8 bis 1:16 erkennbar, wenn die Effekte der Serumverdünnung den Veränderungen der Fluoreszenzwerte zugeordnet werden. In den höheren Verdünnungsstufen des Konjugates ändern sich die QFI-Werte nur noch sehr wenig in Abhängigkeit von der Verdünnung und damit auch vom C3b-Gehalt des Serums. Im Bereich einer geringen Konjugatverdünnung ist mit zunehmender Serumverdünnung ein nichtlinearer Abfall in den Fluoreszenzwerten erkennbar. Aufgrund der Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit für das Konjugat eine Verdünnung 1:8 gewählt.

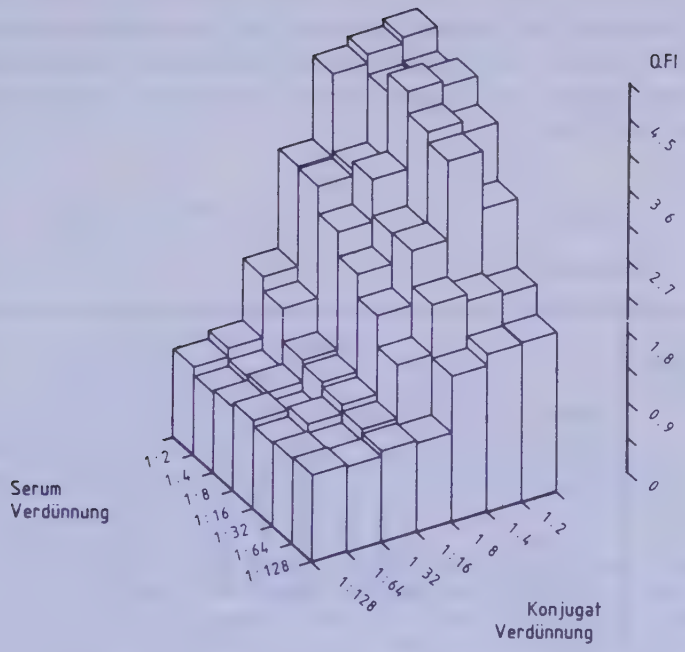

Abb. 11: Abhängigkeit der realtiven Fluoreszenzintensität (QFI) von Serum- und Konjugatverdünnungen.

2.1.3 Verdünnung des Humanserums

Um zu testen, welche der Serumverdünnungen für die C3b-Bestimmung am günstigsten sei, wurden 25 Seren von gesunden männlichen Personen in Verdünnungen von 1:2 bis 1:64 auf Rattennierenschnitten inkubiert. Nach anschließender Behandlung der Schnitte mit FITC-konjugiertem Anti-Human C3 in einer Verdünnung von 1:8 wurde die FI der Glomerula und des Rindengewebes gemessen sowie die relative FI (QFI) berechnet. Die Fluoreszenzintensität in den Glomerula und Rindengewebe der Rattennierenschnitte und somit auch der QFI-Wert nimmt mit steigender Serumverdünnung ab.

Mit Hilfe der Korrelations- und Regressionsanalyse wurde festgestellt, daß zwischen den QFI-Werten und dem Verdünnungsgrad des Serums eine negative Korrelation besteht. In Tabelle 6 sind am Beispiel von zwei Seren die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

Serum-verdünnung	Fluoreszenzintensität (FI)					
	Serum 1			Serum 2		
	Glomerula	Rindegewebe	QFI	Glomerula	Rindegewebe	QFI
1 : 2	10,81	2,65	4,08	7,72	2,49	3,10
1 : 4	5,76	1,49	3,87	3,52	1,54	2,29
1 : 8	4,45	1,13	3,97	2,63	1,11	2,37
1 : 16	2,23	0,90	2,47	1,02	0,65	1,57
1 : 32	1,24	0,98	1,27	1,02	0,65	1,56
1 : 64	0,58	0,72	0,80	0,76	0,69	1,10

Tab. 6: Fluoreszenzintensität (FI) in Glomerula und Rindengewebe der Rattennierenschnitte in Abhängigkeit vom Verdünnungsgrad der Humanseren, mit denen die Schnitte inkubiert wurden.

Hierbei betrug die Korrelation zwischen der relativen Fluoreszenzintensität (QFI) und Serumverdünnung für das Serum 1: $r = -0,97$ und für das Serum 2: $r = -0,93$. Bei der Zunahme einer Verdünnungsstufe (Zehnerpotenz) nimmt der QFI-Wert um 0,49 (Serum 1) bzw. 0,27 (Serum 2) ab. Diese Abnahme der QFI

mit steigender Serumverdünnung ist signifikant ($P < 0{,}001$). Dieser signifikante Abfall ließ sich bei allen 25 getesteten Seren nachweisen. Bei einer Verdünnung von 1:2 ist die unspezifische Anfärbung des Rindengewebes relativ hoch; in der nächsten Verdünnungsstufe 1:4 fiel die unspezifische Fluores-

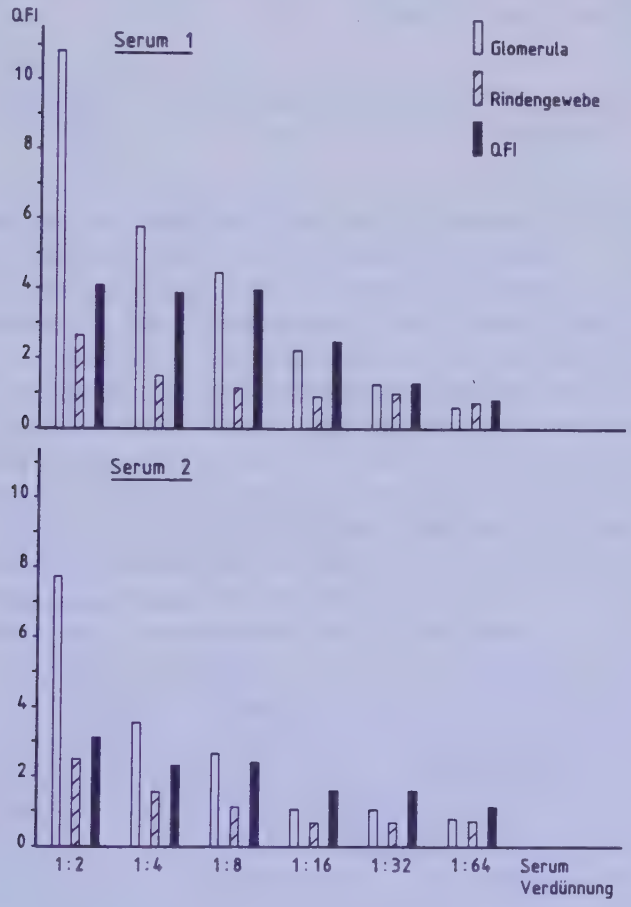

Abb. 12: Fluoreszenzintensität (FI) in Glomerula, in Rindengewebe und relative Fluoreszenzintensität (QFI) nach Inkubation der Rattennierenschnitte mit Humanserum 1 (oben) und Serum 2 (unten) in Verdünnung 1:2 bis 1:64.

zenz des Rindengewebes um 44% ab (Tab. 6). Bei weiteren Verdünnungen der Seren von 1:8 bis 1:32 fällt die FI in Glomerula ab, jedoch bleibt die unspezifische Anfärbung des Rindengewebes bis zu einer Verdünnung des Serums von 1:64 relativ konstant (Abb. 12). Somit wurde aufgrund dieser Voruntersuchungen in der vorliegenden Arbeit für die C3b-Bestimmung eine Humanserumverdünnung von 1:8 gewählt.

2.2 Untersuchungen über den Einfluß der FI-Messung auf die C3b-Werte

Es ist allgemein bekannt, daß bedingt durch die Zersetzung des FITC unter UV-Bestrahlung, die Fluoreszenzintensität der Präparate abfällt. Somit könnte dieser Abfall in den Nierenschnitten bei der C3b-Bestimmung in dem angewandten Meßsystem eine Fehlerquelle darstellen. Um den Abfall der Fluoreszenzintensität in Glomerula der mit Nephrotoxin behandelten Rattennieren während der Messung zu testen, wurden Gewebeschnitte von Nieren RGN 82/12 und RGN 282/12 mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen-ϑ-Globulin inkubiert und die FI in den Glomerula an gleicher Stelle (Ausschnitt) über je 10 Sekunden gemessen. Die Schnitte der Niere RGN 83/5 wurden mit Humanserum und anschließend mit FITC-konjugiertem Anti-Human C3 von der Ziege inkubiert und die Messung der FI wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 13 dargestellt. In den drei untersuchten Nierenschnitten nimmt die Fluoreszenzintensität unter Bestrahlung (Wellenlänge 490 nm) mit der Zeit ab. Die Verlaufskurven sind deutlich nichtlinear und in allen Parametern (Höhe der anfänglichen FI, Stärke des Abfalls der Kurve, asymptotischer Grenzwert) für die jeweilige Niere spezifisch. So wurde im Glomerulum im Nierenschnitt RGN 82/12 ein höherer FI-Ausgangswert (FI = 18,29) und langsamerer Abfall der Fluoreszenz als im Nierenschnitt RGN 282/12 (FI = 11,18) festgestellt. Einen niedrigen anfänglichen FI-Wert (FI = 6,09) und sehr langsamen Abfall zeigt der mit Humanserum behandelte Nierenschnitt RGN 83/5. In diesem FI-Meßbereich lagen auch die FI-Werte der C3b-Bestimmung in Humanseren (Tab. 11).

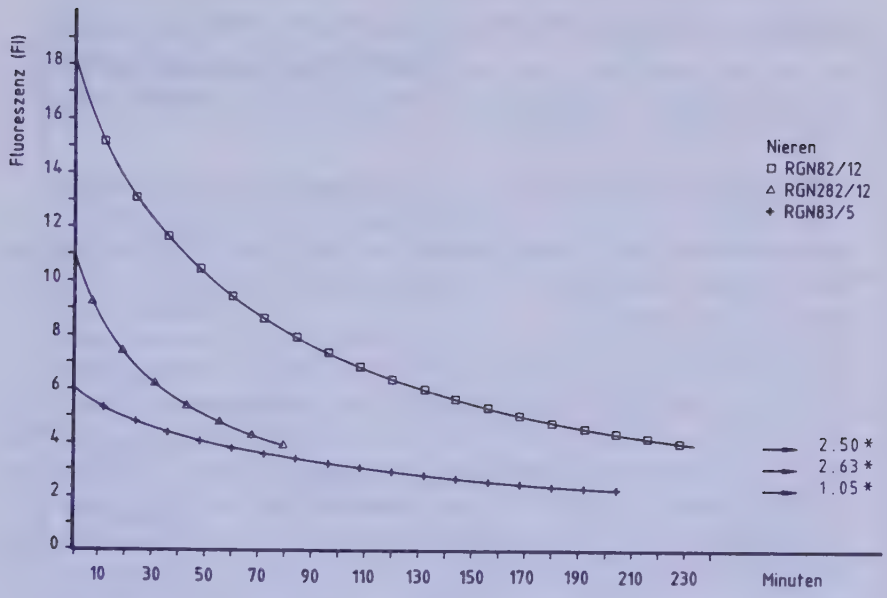

Abb. 13: Abfall der Fluoreszenzintensität (FI) während der Messung der gleichen Stelle im Glomerulum in Abhängigkeit von der Zeit (drei verschiedene Rattennieren).

* asymptotischer Grenzwert

Um das Ausbleichen der Präparate bei der Suche nach geeigneten Meßstellen (Glomerula) zu vermeiden, wurde die UV-Bestrahlung jeweils abgeschaltet und erst bei der FI-Messung, die nur ca. 0,5 Sekunde dauert, wieder eingeschaltet. Damit ist der FI-Abfall im Schnitt für die C3b-Meßwerte ohne Bedeutung. Andererseits wurden aus den Meßwerten (Mittelwerten) für die Glomerula und Rindengewebe Quotienten gebildet. Da man annehmen kann, daß die FI im Rindengewebe etwa um den gleichen Faktor abnimmt wie in den Glomerula, dürften Fehler durch die Zeitabhängigkeit der FI-Messung relativ klein sein.

2.3 Bedeutung von Lagerungszeit und -temperatur der Seren

Nach der Untersuchung des Substrates für die C3b-Anlagerung war es erforderlich, auch die wichtigen Bedingungen der Serumpräparation zu testen, um C3b im Humanserum bestimmen zu können.

Nach Literaturangaben hat die Serumpräparation einen erheblichen Einfluß auf die gemessene Komplement-Aktivität bzw. C3-Konzentration (56). Verschiedene Autoren geben unterschiedliche Bedingungen hinsichtlich der Lagerungszeit und -temperatur der Seren an (51; 86).

Besonders unbeständig ist das aktive C3b in gelagerten Seren, denn die Serumalterung führt rasch zur Umwandlung von C3b in C3c und C3d (32; 160; 165). Zur Erhaltung seiner Eigenschaften muß das frisch gewonnene Serum vor Licht geschützt und dauernd gekühlt werden, sonst fällt die hämolytische Aktivität des Serums durch die C3-Umwandlung, besonders in den ersten Stunden nach der Entnahme, in steiler Kurve ab (56). Im Vorversuch wurde der Einfluß unterschiedlicher Lagerungszeit und -temperatur der Seren auf die C3b-Konzentration bei 20 gesunden Personen mit der Immunfluoreszenztechnik zunächst qualitativ getestet. Das Vollblut wurde ohne Zusatz eines Antikoagulans nach dreistündiger Lagerung bei $4^{o}C$ zentrifugiert, das Serum anschließend portioniert und bei ca. $20^{o}C$, $4^{o}C$, $-20^{o}C$ und $-70^{o}C$ aufbewahrt. Nach jeweils 24 Stunden, 48 Stunden, 7 Tagen, 1 Monat, 3 Monaten oder 6 Monaten Lagerung wurden die Nierenschnitte mit Humanseren und anschließend mit FITC-konjugiertem Anti-Human C3 von der Ziege bei $37^{o}C$ inkubiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, ließ sich in den Glomerula der Rattenniere nach Inkubation mit Seren, die nur 24 Stunden gelagert waren, bei allen getesteten Lagerungstemperaturen der Seren, eine Fluoreszenz (+) feststellen. Mit 24^{h}, 7 d und 1 Monat gelagerten Seren war nur bei Lagerungstemperaturen von $-20^{o}C$ und $-70^{o}C$ eine Fluoreszenz (+) nachweisbar. Nach 3 Monaten

Lagerungszeit der Seren	Temperatur			
	20° C	4° C	- 20° C	- 70° C
24 Stunden	+	+	+	+
48 Stunden	-	-	+	+
7 Tage	-	-	+	+
1 Monat	-	-	+	+
3 Monate	-	-	±	+
6 Monate	-	-	-	±

Tab. 7: Qualitative Auswertung der Fluoreszenz in Glomerula der Rattenniere nach Inkubation der Schnitte mit Humanseren und FITC-markiertem Anti-Human C3. Nachweis spezifischer Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und -temperatur der Seren.

Lagerung bei -20°C konnte nur bei einem Teil der untersuchten Seren (29%) eine Fluoreszenz (±) festgestellt werden. Bei einer Lagerungstemperatur von -70°C war die Fluoreszenz in Glomerula nach 3 und zum Teil nach 6 Monaten noch sichtbar (±). Hierbei ist zu vermerken, daß die qualitative Fluoreszenz nur optisch ohne Anwendung von FI-Meßgeräten, die viel empfindlicher sind, bestimmt wurde.

Um den Einfluß der Lagerungsdauer und der Temperatur auf den C3b-Gehalt des Humanserums genauer zu untersuchen, wurden in 29 Seren von gesunden Personen die bei der beschriebenen

C3b-Reaktion auftretende Fluoreszenz quantitativ bestimmt und die QFI-Werte berechnet. Mit diesen Seren, die, wie im Versuch der Tabelle 5, bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange gelagert waren, wurden Nierenschnitte der Ratte RGN 77/6 inkubiert. Nach der Markierung von C3b mit FITC-markiertem Anti-Human C3 konnte die FI gemessen und die QFI-Werte berechnet werden.

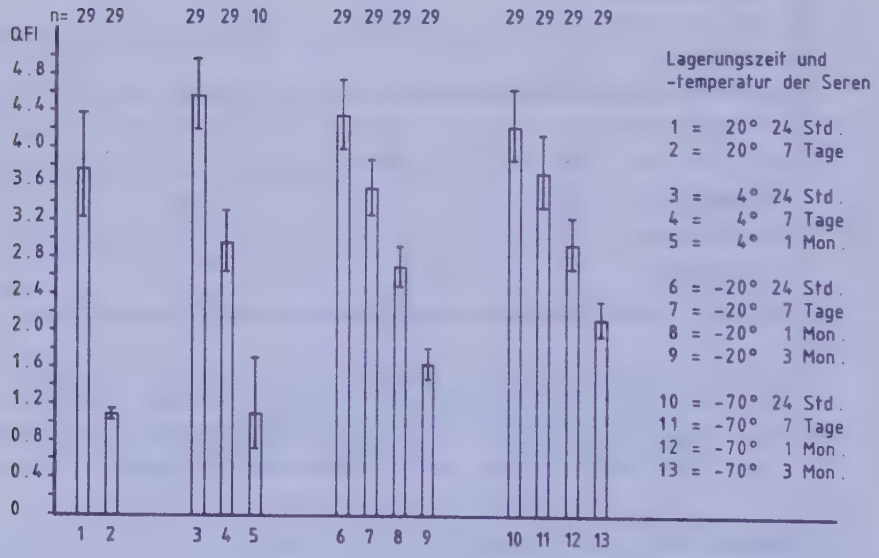

Abb. 14: Relative Fluoreszenzintensität (QFI) der Glomerula in Nierenschnitten von Ratten, die mit Nephrotoxin injiziert worden waren, nach Inkubation der Schnitte mit Humanserum* und anschließend mit FITC-konjugiertem Anti-Human C3 (geometrische Mittelwerte mit 95% Vertrauensbereich).

* nach unterschiedlicher Lagerungszeit und -temperatur

Die Ergebnisse wurden mit der Methode der mehrfachen Varianzanalyse statistisch bearbeitet. Hierbei zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit der relativen Fluoreszenz (QFI) von der Lagerungszeit und -temperatur. Bei Lagerung der Seren in 20°C und 4°C wurde ein signifikanter Abfall ($P \leq 0{,}001$) der QFI zwischen den Lagerungszeiten 24^h und 7 d festgestellt (46,02% erklärter Varianz). Ebenso ließ sich bei Lagerung der Seren in -20°C und -70°C zwischen den Lagerungszeiten von 1 Monat und 3 Monaten eine signifikante Abnahme der QFI (60% erklärter Varianz) nachweisen.

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, besteht eine deutliche Abhängigkeit der C3b-Werte im Serum von der Lagerungszeit und -temperatur der Seren. Der stärkste Aktivitätsverlust tritt bei einer Lagerungstemperatur von 20°C auf; hier kommt es bereits nach 7 Tagen zu einem Abfall der QFI von 3,8 auf 1,0, während dies bei einer Lagerungstemperatur von 4°C erst nach 4 Wochen eintritt. Bei Lagerungstemperaturen von -20°C und -70°C kommt es erst im Zeitraum zwischen 1 Monat und 3 Monaten zu einem deutlichen Abfall der QFI von 4,2 auf 2,0.

Um nachzuweisen, daß es sich bei der FI-Bestimmung tatsächlich um das aktive, bindungsfähige C3b und nicht um C3c handelt, wurde parallel zu den FI-Messungen, in den gleichen 29 Seren, die C3c-Konzentration mittels RID auf Partigen-Platten gemessen. Da die Agarosegelschicht der Platten ein monospezifisches Antiserum gegen Human-C3c enthält, kann man damit nur C3c im Serum bestimmen.

Hierbei wurde auch der Einfluß der Lagerungszeit und Lagerungstemperatur auf die C3c-Meßwerte getestet. Die mit mehrfacher Varianzanalyse ausgewerteten Ergebnisse zeigten, daß die Lagerungszeit (mindestens bis zu 1 Monat) und die Lagerungstemperatur (mindestens im Bereich zwischen 20°C und -70°C) keinen signifikanten Einfluß auf die RID-Meßwerte der C3c-Konzentration hatten (Abb. 15). Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen ist zu entnehmen, daß mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik (IF) und radialer Immundiffusion (RID) zwei verschie-

dene C3-Spaltprodukte bestimmt werden und mit der IF kein C3c erfaßt wird.

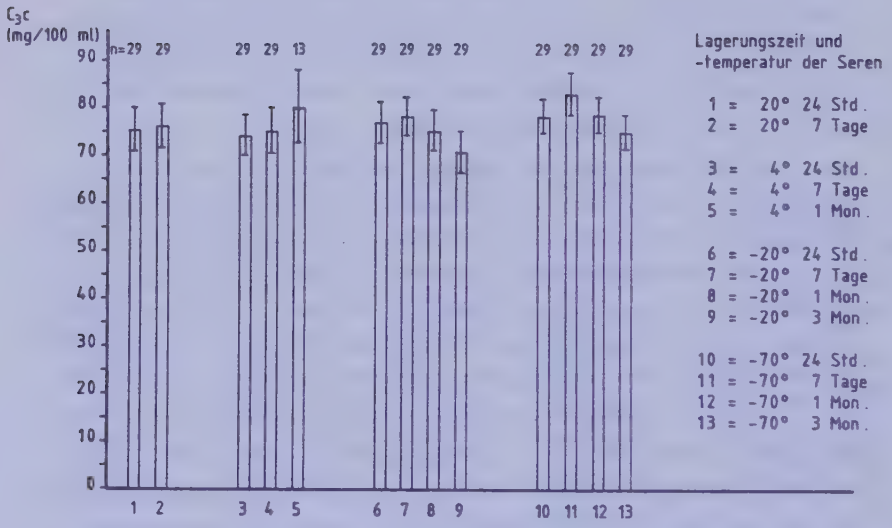

Abb. 15: C3c-Werte (RID) in Humanseren (gleiche wie in Abb. 14) nach unterschiedlicher Lagerungszeit und Lagerungstemperatur (geometrische Mittelwerte mit 95% Vertrauensbereich).

3. C3b-Bestimmung mit dem Immunfluoreszenztest und C3c-Messung mit der Methode der radialen Immundiffusion: Vergleich der Ergebnisse

Die im Versuchsablauf benützten Materialien, das Antigensubstrat, die Humanseren und das Konjugat wie auch der meßtechnische Aufbau der Fluoreszenzoptik, wurden in den aufgeführten Vorversuchen überprüft und für die C3b-Bestimmung mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik standardisiert. Damit ist die Reproduzier-

barkeit der Ergebnisse gewährleistet und die Voraussetzung für die praktische Anwendung des Immunfluoreszenztests zur C3b-Bestimmung geschaffen.

Um Nachzuweisen, daß bei der FI-Bestimmung das hitzelabile C3b erfaßt wird, und um eine Quantifizierung der FI-Meßergebnisse anzustreben, sollte im folgenden Versuch geprüft werden, ob eine Korrelation zwischen den QFI-Werten von C3b und den C3c-Meßwerten nach der RID-Methode besteht. Hierzu wurden Seren von 17 gesunden Personen untersucht. Jedes Serum wurde in drei Aliquots aufgeteilt und diese wiederum unterschiedlich behandelt:

a) gelagert 24^{h} bei $4^{o}C$ (frisch = FR)
b) hitzeinaktiviert 30 min. bei $56^{o}C$ im Wasserbad (hitzeinaktiviert = HI)
c) gelagert 7 Tage bei Zimmertemperatur (gealtert = GE)

In jeder Serumprobe (a, b, c) wurde die C3b-Konzentration mittels Immunfluoreszenz und die C3c-Konzentration in M-Partigen-Platten bestimmt. Die Ergebnisse dieser vergleichenden Tests sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Die C3b-Meßwerte (QFI) der frischen Seren (FR) schwankten zwischen 2,87 und 6,32, die der hitzeinaktivierten (HI) um 0,91 bis 1,09 und die der gealterten (GE) zwischen 0,96 und 1,09. Von den für die gleichen frischen Seren erhobenen Meßwerten der C3c-Bestimmung mittels der radialen Immundiffusion lagen 16 Werte in Grenzen der normalen Variationsbreite (50 bis 120 mg C3c/100 ml nach Angabe der Behring-Werke), und zwar zwischen 72,6 und 127 mg C3c/100 ml, und ein Wert überschritt diesen Meßbereich (159,6 mg C3c/100 ml). Nach Hitzeinaktivierung waren die C3c-Werte der gleichen Seren erniedrigt (35,2 bis 85,8 mg/100 ml). Hierbei wurde ein Abfall der C3c-Konzentration (RID) zwischen 17 und 60% im Vergleich zu dem frischen Serum festgestellt.

Die C3c-Meßwerte der gealterten Seren (GE) entsprachen in der Höhe denen mit frischen Seren und lagen im Bereich zwischen

Serum	Immunfluoreszenz (IF) C_3b (QFI)			Radiale Immundiffusion (RID) C_3c (mg/100 ml)		
	FR	HI	GE	FR	HI	GE
1	3,56	0,97	0,98	83.4	45.5	83.4
2	3.92	1.02	1.03	99.0	52.8	99.0
3	3.88	1.03	1.01	99.0	72.8	96.0
4	3.40	1.07	0.93	81.2	49.2	80.2
5	4.28	0.99	0.99	108.2	85.8	104.2
6	4.17	0.92	0.99	108.2	56.6	106.4
7	2.93	0.97	1.06	72.6	35.2	72.6
8	2.87	0.91	0.98	72.6	52.8	72.0
9	2.98	1.03	1.00	72.6	60.6	72.6
10	4.17	0.91	0.99	103.6	49.2	102.0
11	6.32	1.11	1.09	159.6	64.4	156.2
12	5.18	1.11	0.97	127.8	56.6	126.2
13	4.12	0.95	0.99	103.6	52.8	103.6
14	5.20	1.00	0.99	122.8	49.2	122.6
15	4.32	1.01	1.00	113.0	52.8	113.6
16	4.35	1.04	0.98	113.0	52.8	112.0
17	5.17	0.99	0.96	122.8	60.6	124.2

Tab. 8: C3b- und C3c-Werte im gleichen Serum nach unterschiedlicher Behandlung der Seren: frisch (FR), hitzeinaktiviert (HI) und gealtert (GE).

72,0 und 156,2 mg C3c/100 ml. Es wurde geprüft, ob zwischen den Meßwerten von C3b und C3c in unterschiedlich behandelten Seren eine Korrelation besteht. In Tabelle 9 sind die statistischen Parameter der Korrelationsberechnung zusammengestellt.

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, besteht eine sehr gute Korrelation ($r = 0^{*},99$) zwischen C3b- und C3c-Meßwerten in frischen Seren (FR) wie auch zwischen den Meßwerten der RID in frischen und gealterten Seren (GE) ($r = 1$).

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 6% liegt die Korrelation zwischen C3b - FR und C3b - HI an der Grenze der statistischen Sicherung; bei den übrigen Vergleichen der Tabelle 9

Variablenpaar	Mittelwert C_3b/C_3c QFI mg/100ml $\bar{X}$	Standard-abweichung S	Korrelations-koeffizient r	Irrtumswahr-scheinlichkeit P (r)
IF - FR IF - HI	4,17 1,00	0,92 0,06	0,46	0,06
IF - FR IF - GE	4,17 1,00	0,92 0,04	0,21	0,41
IF - HI IF - GE	1,00 1,00	0,06 0,04	0,14	0,58
RID - FR RID - HI	103,71 55,86	23,07 11,23	0,34	0,18
RID - FR RID - GE	103,71 102,75	23,07 22,62	1,00	0,00
IF - FR RID - FR	4,17 103,71	0,92 23,07	0,99	0,00
IF - HI RID - HI	1,00 55,86	0,06 11,23	0,23	0,37
IF - GE RID - GE	1,00 102,75	0,04 22,62	0,26	0,32

Tab. 9: Korrelationsberechnung für den Vergleich der C3b- und C3c-Werte in Abhängigkeit von der Behandlung der Seren: frisch (FR), hitzeinaktiviert (HI) und gealtert (GE).

besteht keine lineare Beziehung zwischen den Meßwerten. Da in diesem Versuch in den 17 frischen Seren eine sehr gute Korrelation zwischen den C3b- und C3c-Meßwerten besteht, ergibt sich aus den berechneten Mittelwerten, daß 103,7 mg C3c/100 ml im Serum einer C3b-Konzentration entsprechen, die mit der standardisierten Immunfluoreszenzmethode eine relative Fluoreszenzintensität (QFI) von 4,17 liefert, d.h. 1 mg C3c/100 ml entspricht einer C3b-Konzentration mit einer QFI von etwa 0,04.

Um die relativen Fehler der C3b-Bestimmung mit der Immunfluoreszenzmethode statistisch zu berechnen, wurde eine Verdünnungsreihe von 1:4 bis 1:64 des gleichen Serums (N78/71) angesetzt und die Fluoreszenzintensität (FI) auf 20 Nierenschnitten (RGN 77/8) für jede Verdünnung gemessen. In jedem Nierenschnitt wurde die FI von 20 Glomerula und 20 Gewebestellen ermittelt. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität der Glomerula und des Rindengewebes sowie die relative Fluoreszenzintensität (QFI) der Nierenschnitte sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Serum Verdünnung	Fluoreszenzintensität Glomerula		Fluoreszenzintensität Rindengewebe		QFI		Relative Differenzen (%)
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Meßwert y	Schätzwert $\hat{y}$	$\frac{y-\hat{y}}{y}$
1 : 64	0,92	0,06	0,94	0,07	0,98	1,25	-28,80
1 : 32	2,28	0,18	0,95	0,06	2,46	2,25	+ 8,54
1 : 16	3,77	0,53	1,07	0,11	3,49	3,23	+ 6,88
1 : 8	4,88	0,73	1,17	0,17	4,16	4,22	- 1,44
1 : 4	6,26	0,65	1,25	0,16	5,07	5,21	- 2,76
Korrelationskoeffizient=r	0,99		0,98		0,99		

Tab. 10: Regressionsberechnung für den Vergleich der Fluoreszenzintensität (FI) in Glomerula und Rindengewebe der Rattenniere und der Serumverdünnung.

Die Auswertung der Meßdaten zeigte, daß über den gesamten Konzentrationsbereich der Serum-Verdünnungsreihe 1:4 bis 1:64 eine sehr gute lineare Beziehung (r = 0,99) zwischen den logarithmisch dargestellten Konzentrationen und der relativen Fluoreszenzintensität (QFI) bestand. Wie aus Tabelle 10 zu ersehen ist, liegt der relative Fehler $(\frac{y-\hat{y}}{y})$ der Methode für den Verdünnungsbereich 1:4 bis 1:32 unter 10%. Bei der Verdünnung 1:8 liegt dieser unter 2% (-1,44%), und in dem Bereich wurden C3b-Bestimmungen durchgeführt.
Da in der vorliegenden Arbeit der Immunfluoreszenztest mit Seren in einer Verdünnung 1:8 durchgeführt wurde, ist dieser Fehler ohne Bedeutung für die C3b-Meßwerte.

4. Anwendung der Methode zur quantitativen Bestimmung von C3b

Nachdem sich gezeigt hat, daß es möglich ist, mit Hilfe der beschriebenen Immunfluoreszenzmethode den aktiven C3-Anteil C3b quantitativ zu bestimmen, wurde diese Methode bei verschiedenen Personenkollektiven angewandt. Hierzu wurde die C3b-Bestimmung durchgeführt, und zwar in Seren von

349 (270 männliche und 79 weibliche) gesunden Personen aus der Umgebung von Düsseldorf, die im Institut für Hygiene auf Tropentauglichkeit untersucht wurden,

424 schwangeren Frauen aus der Ambulanz der Frauenklinik der Universität Düsseldorf und

656 sechzigjährigen Männern aus Wohngebieten mit unterschiedlicher Luftverunreinigung (Duisburg und Gummersbach).

4.1 Untersuchungen über den Einfluß der Jahreszeiten, des Alters und Geschlechts auf den C3b-Gehalt des Serums gesunder Personen

Es wurde untersucht, ob und in welcher Weise Abhängigkeiten zwischen dem C3b-Meßwert, Alter und Geschlecht der Probanden und der Jahreszeit der Untersuchung bestehen. Die durchgeführten statistischen Tests sollten einen Überblick über die

Variabilität der C3b-Meßwerte bei gesunden Personen verschaffen. Als gesund wurden Personen bezeichnet, die nach der ärztlichen und laborchemischen Untersuchung im Institut ohne krankhaften Befund waren. Schwangere Frauen wurden bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Das Datenmaterial wurde nach vier Altersgruppen (bis 30 J., 31-40 J., 41-50 J., ab 51 J.), vier Untersuchungszeiträume, und zwar Frühjahr (März, April, Mai), Sommer (Juni, Juli, August), Herbst (September, Oktober, November) und Winter (Dezember, Januar, Februar) sowie nach Geschlecht gegliedert. Die Alters- und Geschlechtsverteilung ist in Abbildung 16 dargestellt.

Da die Voraussetzungen für die Gültigkeit der parametrischen Testverfahren (Normalverteilung, Varianzhomogenität) nicht erfüllt sind, wurde für die statistische Überprüfung der Lageunterschiede der parameterfreie U-Test verwendet. Ein Ergebnis wurde dann als signifikant bezeichnet, wenn der Lageunterschied mit Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5% gesichert ist ($P < 0{,}05$). Die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der C3b-Konzentration (QFI) in den einzelnen Gruppen und die Probandenzahl sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Jahreszeiten	Probanden bis 30 Jahre						Probanden 31 - 40 Jahre						Probanden 41 - 50 Jahre						Probanden über 50 Jahre					
	männlich			weiblich			männlich			weiblich			männlich			weiblich			männlich			weiblich		
		QFI			QFI			QFI			QFI			QFI			QFI			QFI			QFI	
	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S
Frühjahr	19	2,29	0,67	15	2,00	0,54	38	2,28	0,72	7	2,20	0,45	22	2,82	0,89	5	2,69	1,02	16	2,75	1,01	2	1,94	
Sommer	6	3,00	0,50	6	2,43	0,50	14	3,28	0,36	3	2,73	0,36	13	4,70	1,86	2	3,69	1,83	4	5,48	1,60	1	2,02	
Herbst	19	2,70	0,58	10	2,26	0,52	37	2,88	0,81	9	2,20	0,46	19	3,18	0,73	1	5,06	——	5	4,53	0,90	—	——	
Winter	18	2,40	0,55	7	2,33	0,38	26	2,45	0,76	8	2,27	0,58	9	2,66	0,63	3	2,90	1,39	5	2,61	1,23	—	——	

Tab. 11: C3b-Werte (QFI) in Seren von 349 Probanden in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Jahreszeiten (geometrische Mittelwerte

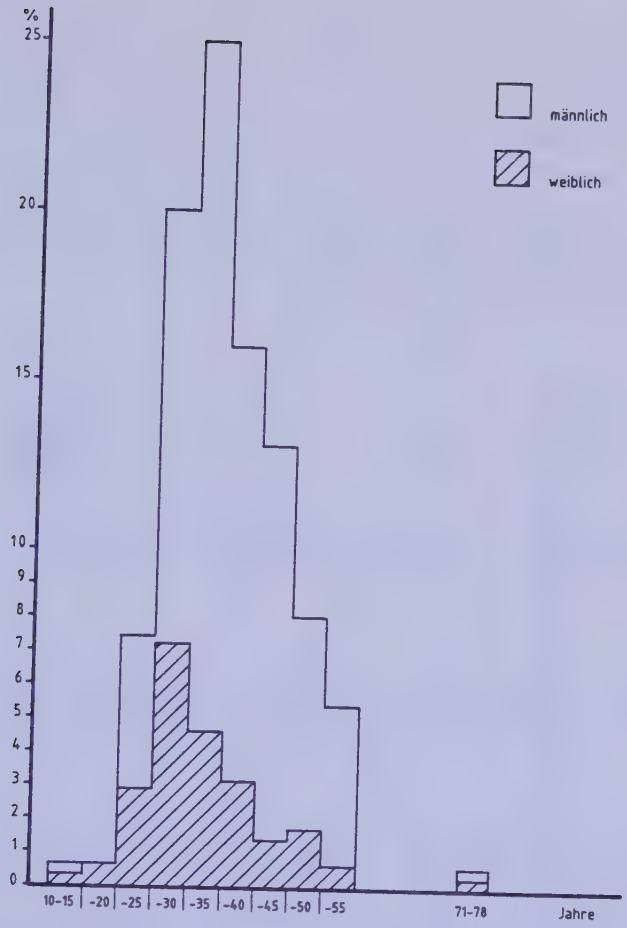

Abb. 16: Altersverteilung in der Gruppe der 349 untersuchten gesunden Personen, davon männlich 270 (77,4%) und 79 weiblich (22,6%).

Da die C3b-Werte in den einzelnen Altersklassen bei Männern und Frauen in den Jahreszeiten Winter/Frühjahr und Sommer/Herbst keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, wurden für die statistische Auswertung die Daten in zwei Jahreszeiten: Winter

(Winter + Frühjahr) und Sommer (Sommer + Herbst) zusammengefaßt. Auffallend ist die Abhängigkeit der C3b-Werte von der Jahreszeit, in der sie bestimmt wurden. Bei männlichen Personen in allen Altersgruppen ist ein deutlicher Jahresgang zu bemerken, wobei die C3b-Werte (QFI) im Sommer höher liegen als die im Winter. Diese Unterschiede sind statistisch mit mindestens 5% Irrtumswahrscheinlichkeit gesichert (Tab. 11). Besonders große jahreszeitliche Unterschiede der C3b-Konzentration sind bei Männern im Alter von 41-50 Jahren und über 50 Jahren zu beobachten (Abb. 17).

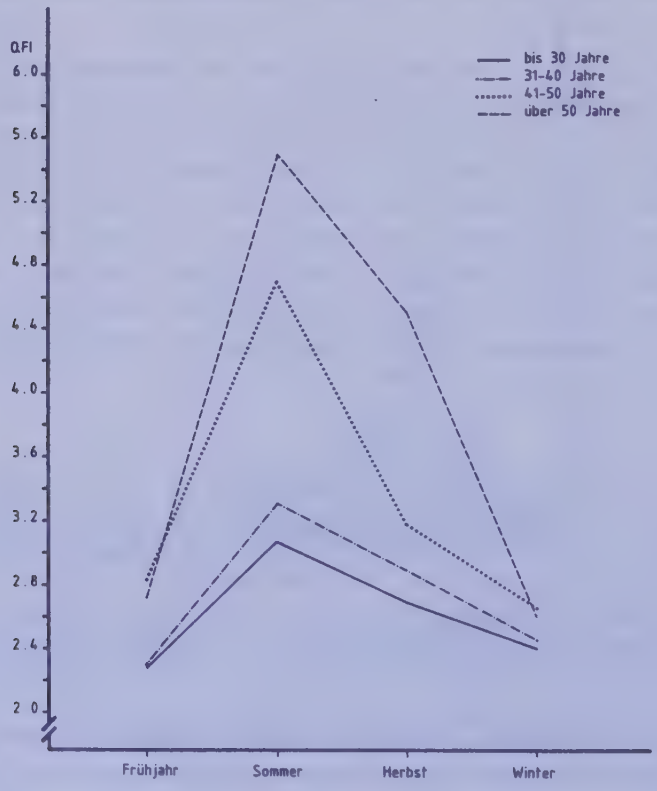

Abb. 17: C3b-Werte (QFI) in Seren von männlichen Probanden in Abhängigkeit von Jahreszeit und Alter (geometrische Mittelwerte).

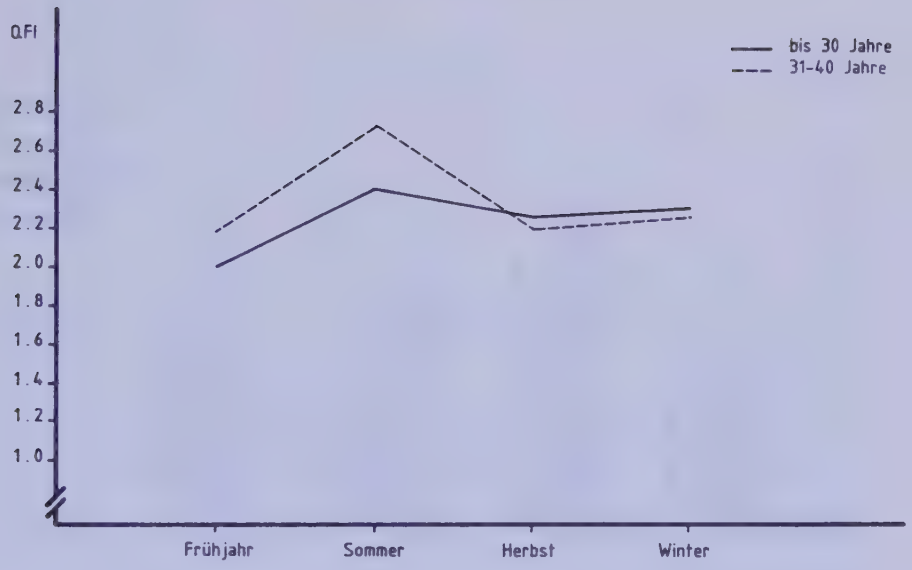

Abb. 18: C3b-Werte (QFI) in Seren von weiblichen Probanden in Abhängigkeit von Jahreszeit und Alter (geometrische Mittelwerte).

Bei Frauen konnte man den Jahresgang nur in zwei Altersgruppen, und zwar "bis 30 Jahre" und "31-40 Jahre" untersuchen (Abb. 18). In diesen beiden Altersgruppen ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der C3b-Aktivität und den Jahreszeiten wie bei den Männern. In den höheren Altersgruppen der untersuchten Frauen ist aufgrund der vorliegenden Daten keine gesicherte Aussage möglich, da der Stichprobenumfang zu klein war (Tab. 11). Im gleichen Datenmaterial wurde statistisch geprüft, ob die C3b-Konzentration im Serum vom Alter der 349 gesunden Personen abhängt. Bei Frauen konnte die Abhängigkeit der C3b-Aktivität vom Alter aus Mangel an Versuchspersonen nur bis zum 40. Lebensjahr bewertet werden. In den Altersgruppen "bis 30 Jahre" und "31-40 Jahre" waren weder

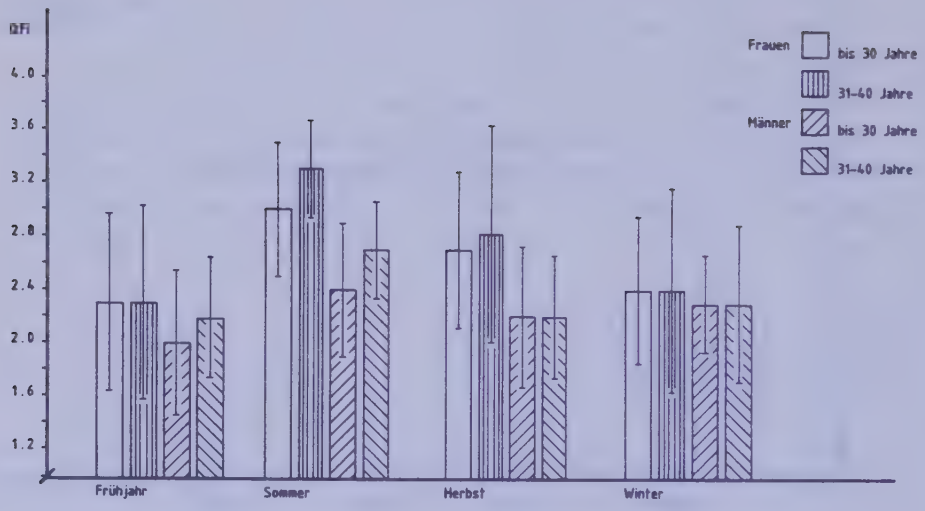

Abb. 19: C3b-Werte (QFI) in Seren von 242 weiblichen und männlichen Probanden im Alter bis 40 Jahre in Abhängigkeit von Alter, Jahreszeit und Geschlecht (geometrische Mittelwerte mit Standardabweichung).

bei männlichen noch bei weiblichen Probanden signifikante Unterschiede der C3b-Aktivität in Abhängigkeit vom Alter festzustellen (Abb. 19).

Bei Männern in den Altersgruppen "41-50 J." und "über 50 J." ließ sich eine Erhöhung der C3b-Aktivität im Vergleich zu der Altersgruppe "30-40 J." statistisch sichern (P = 0,014).

Um zu überprüfen, ob die C3b-Aktivität vom Geschlecht abhängt, wurden die Meßwerte von männlichen und weiblichen Probanden im Alter bis zu 40 Jahren miteinander verglichen. Dabei konnten die beiden Altersgruppen "bis 30 J." und "31-40 J." jeweils zusammengefaßt werden, da sie sich in beiden Geschlechtern

nicht signifikant voneinander unterschieden. Somit wurden in der statistischen Prüfung (U-Test) folgende Gruppen verglichen:

Männer bis 40 J., Sommer - Frauen bis 40 J., Sommer
Männer bis 40 J., Winter - Frauen bis 40 J., Winter.

Im Sommer sind nur in der Altersklasse "bis 40 J." die C3-Werte bei Männern gegenüber der gleichen Altersklasse der Frauen signifikant erhöht ($P < 0,001$). Die im Winter gemessene C3b-Aktivität ist bei den Männern bis 40 Jahre im Mittel nur geringfügig höher als bei den Frauen der gleichen Altersklasse. Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($P = 0,22$).

4.2 C3b-Bestimmungen in Seren von schwangeren Frauen. Einfluß des Stadiums der Schwangerschaft, der Jahreszeiten und der Blutgruppenzugehörigkeit

Die C3b-Konzentration wurde im Serum von 424 gesunden Frauen im Alter von 15-45 Jahren im Verlauf einer normalen Schwangerschaft bestimmt.

Nach ihrem Lebensalter waren die untersuchten schwangeren Frauen folgendermaßen aufgeteilt: bis 20 Jahre = 50 Frauen (11,79%), 21-30 J. = 240 Frauen (56,60%), 31-40 J. = 127 Frauen (29,96%) und 41-45 J. = 7 Frauen (1,65%).

Die Ergebnisse der C3b-Bestimmungen in Seren von schwangeren Frauen sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Als Vergleich zu den Ergebnissen der Schwangeren dienten die Werte der C3b-Bestimmung von 65 nicht schwangeren Frauen im Alter bis 40 Jahre, abhängig von den Jahreszeiten Sommer und Winter. Die Altersverteilung der nicht schwangeren Frauen (Kontrollgruppe) ist in Abbildung 17 dargestellt. Sämtliche Meßwerte wurden nach der Jahreszeit (Sommer oder Winter) und nach dem Schwangerschaftsstadium zum Zeitpunkt der C3b-Bestimmung geordnet.

		Sommer			Winter		
			QFI			QFI	
		n	$\bar{X}$	Sx	n	$\bar{X}$	Sx
schwanger	I. Trimenon	29	3,02	0,95	35	2,75	0,99
	II. Trimenon	50	3,75	1,24	52	2,81	0,66
	III. Trimenon	102	3,38	1,15	156	2,75	0,95
nicht schwanger	bis 40 Jahre	31	2,41	0,25	34	2,20	0,14

Tab. 12: C3b-Werte (QFI) in Seren von 424 gesunden Frauen im Verlauf einer normalen Schwangerschaft, in Abhängigkeit von Jahreszeiten (Sommer und Winter) und Schwangerschaftsstadium, im Vergleich mit nicht schwangeren Frauen.

In Bezug auf das Stadium der Schwangerschaft waren:

64 Frauen im I. Trimenon (1.-14. Schwangerschaftswoche)
102 " " II. " (15.-27. ")
258 " " III. " (27. Woche bis zum Ende der Schwangerschaft).

Wie Tabelle 12 zeigt, sind in allen Gruppen der schwangeren Frauen die C3b-Werte im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen signifikant erhöht ($P < 0,001$). Wie bei nicht schwangeren Frauen und männlichen Probanden (Tab. 11) zeigte sich auch hier ein Jahresgang, wobei die C3b-Meßwerte im Sommer signifikant höher als die im Winter lagen. Im Sommer waren die C3b-Werte des II. Trimenons gegenüber dem I. und III. Trimenon signifikant erhöht ($P < 0,01$), im Winter konnte dagegen

nur ein leichter, nicht gesicherter Anstieg beobachtet werden.

Bei der gleichen Gruppe der schwangeren Frauen wurde überprüft, ob die C3b-Werte von den Blutgruppen und vom Rh-Faktor abhängen (Tab. 13).

	Sommer			Winter			
Blutgruppe		QFI			QFI		Gesamt
	n	$\bar{X}$	S	n	$\bar{X}$	S	
A	92	3,68	1,21	105	2,78	0,85	197
B	21	2,81	0,99	31	2,82	1,08	52
AB	12	3,08	1,20	16	2,45	0,88	28
0	56	3,31	1,04	91	2,78	0,91	147
Rhesusfaktor							
Rh-positiv	96	3,39	1,22	105	2,74	0,87	201
Rh-negativ	55	3,61	1,14	91	2,80	0,95	146
unbekannt	30	3,20	1,00	47	2,73	0,89	77

Tab. 13: C3b-Werte (QFI) in Seren von 424 gesunden Frauen im Verlauf einer normalen Schwangerschaft, in Abhängigkeit von Blutgruppe und Rhesus-Faktor (geometrische Mittelwerte

Bei den schwangeren Frauen waren die Blutgruppen folgendermaßen verteilt: 197 - A, 147 - 0, 52 - B und 28 - AB. Bei 347 der 424 schwangeren Frauen wurde der Rh-Faktor bestimmt: bei 201 Frauen war er positiv, bei 146 negativ.

Die relativ große Anzahl von Frauen mit negativem Rh-Faktor kann man damit erklären, daß viele Frauen, bei denen eine Rh-Inkompatibilität zu erwarten war, über ihren Hausarzt in die Universitätsfrauenklinik überwiesen worden waren. Bei den untersuchten 424 schwangeren Frauen wurde kein signifikanter Einfluß von Blutgruppen und vom Rh-Faktor auf die C3b-Werte im Serum festgestellt (Tab. 13).

4.3 C3b-Bestimmungen in Seren von gesunden 60jährigen Männern aus Wohngebieten mit unterschiedlicher Schadstoffbelastung in der Luft (Duisburg und Gummersbach)

Im Rahmen der von Mitarbeitern des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf im Auftrag des Ministeriums für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführten epidemiologischen Studie zur Erstellung des Luftreinhalteplans NW wurden im Jahre 1977 60jährige männliche Einwohner aus zwei unterschiedlich stark umweltbelasteten Gebieten (Duisburg und Gummersbach) untersucht. Neben den zahlreichen anderen Parametern (z.B. CEA, COHb, chronische Bronchitis) wurde in 362 Seren von gesunden Probanden aus Duisburg und 294 aus Gummersbach (Kontrollgebiet) die C3b-Bestimmung (IF) auf Rattennierenschnitten mit Hilfe der beschriebenen Methode der quantitativen Immunfluoreszenztechnik und parallel die C3c-Konzentration auf M-Partigen-Platten mit der radialen Immundiffusion (RID) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Die Meßwerte der Seren wurden nach Wohngebiet und dem Rauchverhalten der Probanden geordnet: in Duisburg 141 Raucher (R) und 221 Nichtraucher (NR), in Gummersbach 90 Raucher (R) und 204 Nichtraucher (NR).

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, wurden in Seren von Probanden aus Duisburg, sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern, signifikant höhere C3b-Mittelwerte im Vergleich mit Probanden aus Gummersbach festgestellt ($P < 0{,}001$). Die C3b-Mittelwerte

	Duisburg					Gummersbach				
		C_{3b} (QFI)		C_{3c} (mg/100 ml)			C_{3b} (QFI)		C_{3c} (mg/100 ml)	
	n	$\bar{X}$	Sx	$\bar{X}$	Sx	n	$\bar{X}$	Sx	$\bar{X}$	Sx
Raucher gesund (R)	141	3,38	1,05	94,0	16,37	90	2,29	0,67	94,0	20,98
Nichtraucher gesund (NR)	221	3,33	1,05	100,0	18,50	204	2,35	0,73	96,0	17,31

Tab. 14.: C3b- und C3c-Werte in Seren von 60jährigen Männern aus Gebieten mit unterschiedlicher Schadstoffbelastung in der Luft: Duisburg und Gummersbach (geometrische Mittelwerte

zeigten keine signifikante Abhängigkeit vom Rauchverhalten der Probanden, sowohl in Duisburg (QFI (R) = 3,38, QFI (NR) = 3,33) als auch im Kontrollgebiet Gummersbach (QFI (R) = 2,29, QFI (NR) = 2,35). In den gleichen Seren von Probanden aus Duisburg und Gummersbach wie bei der C3b-Bestimmung konnten keine signifikanten Unterschiede in der C3c-Konzentration festgestellt werden (Tab. 14). Auch das Rauchverhalten hatte hierbei keinen Einfluß auf die C3c-Werte bei den Probanden.

V. Diskussion

1. Möglichkeiten der quantitativen C3b-Bestimmung mit Hilfe fluoreszenzserologischer Messungen an histologischen Schnitten

In der Pathogenese vieler Erkrankungen ist die Immunlage des Organismus von großer Bedeutung, wobei neben den Immunglobulinen das Komplementsystem eine wichtige Rolle spielt (30; 55; 67). Die Komplementaktivität bzw. die Konzentration der einzelnen Komplement-Komponenten werden von vielen Faktoren beeinflußt; sie können daher durch eine Störung der Synthese oder des Abbaus durch eine vermehrte Aktivierung oder durch Bindung an Antigen-Antikörper-Komplexe variieren. Die genannten Störungen können u.a. bei Infektionskrankheiten, Entzündungen, Verbrennungen oder auch Autoimmunerkrankungen vorkommen (7; 42; 153).

Eine der wichtigsten Komponenten des Komplementsystems ist das C3. Alle Aktivierungsmöglichkeiten des Komplementsystems, sowohl für den klassischen als auch für den alternativen Weg, verlaufen mit Beteiligung der dritten Komplementkomponente (12; 15; 24; 26; 30). Für die Klinik und Forschung ist es wichtig, die Aktivität bzw. Konzentration der einzelnen Komplementkomponenten, besonders C3, mit Hilfe von funktionellen oder proteinchemischen Tests zu bestimmen (20; 51; 53; 60; 87).

Da die C3-Konzentration im Serum mit der hämolytischen Aktivität des gesamten Komplements korreliert (86), wird z.Z. für die Routine in der Klinik die quantitative C3-Bestimmung mit Hilfe der radialen Immundiffusion (RID) nach Mancini durchgeführt (85). Der technische, finanzielle und personelle Aufwand dieser Methode ist relativ gering. Diese Technik liefert gut reproduzierbare Ergebnisse (51; 87; 129). Weil jedoch C3 in Form vieler unterschiedlicher Spaltprodukte vorliegen kann, ergeben sich bei der C3-Bestimmung methodische Schwierigkeiten (86; 87).

Aufgrund der Antigengemeinschaft zwischen dem im Serum vorhandenen nativen C3 (β1C-Globulin) und der umgewandelten Form C3c (β1A-Globulin) kann mit einem Antiserum sowohl C3 als

auch C3c erfaßt werden, was die Aussagekraft der RID-Tests auf C3 einschränkt. Informationen über den Aktivitätszustand oder den Verlust biologischer Funktionen des C3 sind dann unzugänglich. Ähnlich sind auch andere C3-Nachweismethoden zu werten. Versuche zur Bestimmung der C3-Komponente mit Hilfe der Laser-Nephelometrie blieben erfolglos (Fa. Hyland). Hierbei ergaben sich die Umwandlung der C3-Formen, die Trübung von Seren und die Lagerung des Serums als wesentliche Störfaktoren. Auch mit Hilfe dieser Methode lassen sich nur beide Formen der dritten Komponente mit einem Antiserum gemeinsam erfassen.

In der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell ermöglicht die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von C3-Spaltprodukten im elektrischen Feld eine getrennte Bestimmung der nativen C3-Komponente (β1C-Globulin) und dessen Abbauprodukt C3c (β1A-Globulin). Das Spaltprodukt der Komplement-Aktivierung C3b kann jedoch mit dieser Methode nicht erfaßt werden.

Im Jahre 1974 berichtete Knapp (77), daß es nach Inkubation von Dextran-Gel-Partikeln mit frischem Humanserum zur Bindung einer Substanz kommt, die mit Anti-β1A-Globulin reagiert. Diese Reaktion wurde durch die Fluoreszenzintensität der einzelnen Dextran-Kugeln bestimmt. Aus diesen Befunden konnte nur geschlossen werden, daß es sich bei der abgebundenen Substanz um ein aktives Spaltprodukt des C3 handeln könnte.

In der Literatur liegen bisher keine Angaben über eine Methode zur getrennten quantitativen Bestimmung des C3b vor. Da das C3b eine entscheidende Rolle bei der humoralen Abwehr des Organismus spielt, könnte es für die Forschung und Klinik wichtig sein, das C3b als die aktive, wirksame Form des C3 quantitativ zu bestimmen. Auf diese Weise könnte man im Organismus ablaufende Aktivierungsvorgänge oder Störungen erfassen, die durch den Einfluß verschiedener Inhibitoren oder durch andere Umwelteinflüsse zu einer unerwünschten Umwandlung des C3 (β1C-Globulin) in C3c (β1A-Globulin) führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik eine Methode zur getrennten quantitativen Bestimmung von C3b zu entwickeln.

Um eine immunologische Reaktion in vivo durchführen zu können, war ein Substrat erforderlich, an das sich das C3b bindet. Zur Bindung von C3b mußte ein Antigen-Antikörper-Komplex im Gewebe gewählt werden, dessen Antikörper der IgG- oder IgM-Klasse angehören, weil nur diese mit Komplement reagieren.

Zu diesen Versuchen wurde das Modell der Masugi-Nephritis gewählt, eine von Masugi (90) beschriebene klassische Methode der experimentell erzeugten Glomerulonephritis. Hierzu wurde ein selbst hergestelltes Nephrotoxin verwendet, das Ratten in die Schwanzvene injiziert wurde. Nach Injektion von Nephrotoxin entwickelte sich bei den Versuchstieren eine experimentelle Glomerulonephritis, die sich in Gefäßschädigungen äußert, hauptsächlich in den glomerulären Kapillaren und den zugehörigen Arteriolen der Niere. Die Kapillarwände werden verdickt und ihre Durchlässigkeit verändert. An den Basalmembranen der Glomeruli kommt es zur Bildung von AgAk-Komplexen. Unter dem Elektronenmikroskop erscheinen sie als Niederschläge und lösen bei Versuchstieren Entzündungsreaktionen aus, die mit der akuten Glomerulonephritis des Menschen vergleichbar sind. Diese Komplexe können lokal das Komplement aktivieren und damit zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen. Das Vorhandensein dieser Komplexe nach Nephrotoxin-Injektion kann in der Immunfluoreszenz mit Hilfe von FITC-konjugierten Antiseren (63; 90; 123; 124) nachgewiesen werden.

Die im Abschnitt III. 1.1.2 dargestellten Ergebnisse der Immunfluoreszenz bestätigen die Literaturangaben (63; 90), daß es sich bei den Immunglobulinablagerungen in Glomerula um Antikörper der IgG- und IgM-Klasse handelt.

Untersuchungen von Schlipköter und de Ruiter (132) zeigten, daß die Bildung von AgAk-Komplexen in Glomerula der Rattenniere im Laufe von mindestens 2 Stunden bis höchstens 6 Stunden nach der Injektion von Nephrotoxin ansteigt und daß diese

AgAk-Komplexe fluoreszenzoptisch noch nach 6 Wochen in den Glomerula nachgewiesen werden können. Dementsprechend wurden die Nieren für die C3b-Bestimmung 3 Stunden nach der Nephrotoxin-Injektion aus den Ratten entnommen.

Die Möglichkeit der längeren (1-4 Monate) Lagerung bei -70°C von ganzen Rattennieren bzw. angefertigten Gefrierschnitten erwies sich ohne Einfluß auf die Bindungsfähigkeit des AgAk-Komplexes und für die Methode als vorteilhaft (siehe IV. 2.1). Dadurch wurde es möglich, die C3b-Bestimmung bei einer größeren Anzahl von Seren auf demselben Antigensubstrat (Niere) durchzuführen und C3b-Veränderungen in einzelnen Seren im Zeitablauf zu untersuchen.

Während sich das C3b an Akzeptoren binden kann (42; 54; 109; 124; 134), wirkt das kleinere Bruchstück als bindungsunfähiges C3a, als Anaphylatoxin. Um nachzuweisen, daß es sich bei der Reaktion tatsächlich um das gebundene C3b aus dem menschlichen Serum handelt, wurden Versuche mit: A) frischen, B) hitzeinaktivierten und C) gealterten Seren von gesunden Personen durchgeführt. Parallel zu den C3b-Bestimmungen mittels der Immunfluoreszenztechnik wurde auch die C3c-Konzentration auf M-Partigen-Platten mit Hilfe der radialen Immundiffusion nach Mancini (85) bestimmt.

Nach Inkubation von Nierenschnitten mit frischen Humanseren (Gruppe A) und anschließend mit FITC-markiertem Anti-Human C3-Serum kommt es zur Bildung von fluoreszierenden Komplexen, deren Intensität quantitativ erfaßt werden kann (148). Inkubiert man die Nierenschnitte ohne Serum und behandelt sie danach mit markiertem Anti-Human C3-Serum, entsteht keine meßbare Fluoreszenz in den Glomerula. Es muß sich also um eine immunologische C3-Reaktion und nicht um eine spezifische oder auch unspezifische Anfärbung der Glomerula durch FITC-konjugiertes Antiserum handeln. Eine Autofluoreszenz der Schnitte bei Erregungswellenlänge des FITC (490 nm) konnte nicht nachgewiesen werden.

Nach der Beschickung der M-Partigen-Platten bilden die fri-

schen Seren in der Agaroseschicht Präzipitationsringe, die einer C3c-Konzentration im Normbereich (50-120 mg/100 ml) entsprechen. Aus diesem Versuch kann man entnehmen, daß die Substanz, die an den AgAk-Komplex in Glomerula der Niere gebunden ist, ein Spaltprodukt des C3 sein könnte. Diese Ergebnisse erlauben jedoch noch keine klare Aussage darüber, ob es sich um das Spaltprodukt C3b oder C3c handelt.

Bei Versuchen mit den gleichen, jedoch hitzeinaktivierten Seren (Gruppe B) traten in den Partigen-Platten Präzipitationsringe auf, die kleiner waren als die bei der Anwendung von frischem Serum. Eine Fluoreszenz in den Glomerula nach Inkubation mit den gleichen Seren konnte nicht nachgewiesen werden. Die Einwirkung von höheren Temperaturen (56°C, 30 min.) führte zur Abspaltung von 2D-Globulin (81), wodurch die enzymatische Aktivität des C3b zerstört wurde (76).

Verwendet man Humanseren, die 7 Tage bei Zimmertemperatur gelagert wurden (Gruppe C), so wurde nach der Inkubation der Nierenschnitte keine meßbare Fluoreszenz in den Glomerula der Niere festgestellt. Nach dem Auftragen der Seren auf die M-Partigen-Platten bildeten diese Seren jedoch Präzipitationsringe des gleichen Durchmessers wie bei der Anwendung von frischen Seren (r=1,00). Aus diesem Versuch ist zu entnehmen, daß in Humanseren, die 7 Tage lang bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) gehalten worden waren, das C3b zerstört wurde, so daß eine Bindung an den AgAk-Komplex in der Niere nicht stattfinden konnte.

Die aus den Versuchen gewonnenen Ergebnisse stützen die Annahme, daß C3b sich an den AgAk-Komplex in Glomerula der mit Nephrotoxin behandelten Ratte bindet. Schon im Jahre 1972 postulierte Klein (72; 73; 76) einen multiplen Charakter der dritten Komplementkomponente und nahm fünf Einzelfaktoren des C3 an, die in einer bestimmten Reihenfolge reagieren. Nur drei von diesen C3 "Untereinheiten" wurden bisher rein dargestellt, die beiden anderen zeigten eine Begleitaktivität.

2. Ergebnisse der C3b-Bestimmung

2.1 C3b-Werte bei einem gesunden Personenkollektiv

Da die Beteiligung der Komplementkomponenten im pathologischen Geschehen vieler Erkrankungen bekannt ist, wurden viele Untersuchungen zur Bestimmung des gesamten Komplements (C) oder der C3-Komponente bei verschiedenen akuten und chronischen Erkrankungen durchgeführt (42; 43; 50; 135; 136; 151; 152; 153; 155; 156), jedoch über die Komplementaktivität bei größeren Kollektiven gesunder Personen lagen nur wenige Untersuchungen vor. Die Konzentration bzw. die funktionelle Aktivität der einzelnen Komplementkomponenten können von vielen Faktoren beeinflußt werden. Mit Hilfe der beschriebenen Immunfluoreszenzmethode zur C3b-Bestimmung wurde der Versuch unternommen, den Einfluß einiger Faktoren wie Jahreszeiten, Alter und Geschlecht sowie Schwangerschaft auf die C3b-Werte im Serum von gesunden Probanden nachzuweisen.

2.1.1 Die Abhängigkeit der C3b-Konzentration von der Jahreszeit

Die beschriebenen Experimente (IV. 4.1) zeigen, daß die C3b-Konzentration von der Jahreszeit abhängt, wobei die C3b-Werte bei den untersuchten männlichen und weiblichen Probanden im Sommer/Herbst höher lagen als im Winter/Frühjahr.

Wagner und Mitarbeiter (162) haben bei 289 Kindern eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Immunglobuline IgG und IgM im Serum festgestellt. Hierbei wurden im Sommer signifikant höhere Werte als im Winter gemessen. Auch dieser Befund spricht für die Saisonschwankungen in der humoralen Immunabwehr des Organismus. Hartmann (58) konnte dagegen bei 30 untersuchten gesunden Personen im Alter von 22-85 Jahren keinen Einfluß der Jahreszeiten auf die Komplementaktivitäten nachweisen. In dieser Untersuchung war die Probandenzahl zu klein, um eine gesicherte Aussage zu machen. Auch in Seren von 424 gesunden schwangeren Frauen wurde eine jahreszeitliche Abhängigkeit der C3b-Werte beobachtet. Im Sommer lagen die C3b-Werte höher als im Winter.

Eine mögliche Ursache der jahreszeitlichen Abhängigkeit der C3b-Werte könnte die erhöhte Erkrankungshäufigkeit im Winter/Frühjahr im Vergleich mit Sommer/Herbst sein. Wie Untersuchungen anderer Autoren zeigen, kommt es bei verschiedenen Infektionskrankheiten zu einer zusätzlichen Komplement-Aktivierung und einem erhöhten C3-Verbrauch. Eine Deutung für die wechselnden C3b-Werte im Serum wäre eventuell auch in den jahreszeitlich unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten zu suchen. Zwischen dem Ernährungszustand und Infektionskrankheiten, die das Immunsystem aktivieren, besteht eine enge Wechselbeziehung: Einerseits sind unterernährte Personen gegen Infektionen empfindlicher und andererseits beschleunigt eine Infektion die Entwicklung von Unterernährung (36).

Über den Zusammenhang zwischen Gesamtkomplement, C3 bzw. anderen Komplementkomponenten und der Ernährung des Menschen liegen allerdings nur wenige Untersuchungen vor. In einem Übersichtsreferat (1982) berichtet Beisel (9) über den Einfluß der Aufnahme von Vitaminen, Aminosäuren und Fetten auf die Immunität. Gierhake und Mitarbeiter (45) haben nachgewiesen, daß es beim Menschen durch langdauernde Operationen zu einer Katabolie und infolgedessen zur Abnahme von Immunglobulinen und Komplement kommt. Durch eine parenterale Ernährung konnte der Abfall des C' behoben werden.

Im Tierversuch hat Dubos (35) bei jungen Mäusen einen Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen beobachtet. Da bei der Abwehrreaktion, besonders gegenüber bakteriellen Infektionen, das Komplement beteiligt ist, kann ein Einfluß der mangelhaften Ernährung auf den C3-Gehalt angenommen werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß zur Gewinnung eines hochaktiven Komplements aus frischem Meerschweinchenserum vor der Blutentnahme die Nahrung der Spendertiere mehrere Tage lang aus "Grünfutter" bestehen sollte (56). Eigene Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse. Bei Meerschweinchen, denen 7 Tage lang Grünfutter verabreicht wurde, waren höhere C3b-Werte als bei der Kontrollgruppe, die

Standardfutter erhielt, festzustellen (143). Hierbei könnte Vitamin C einen Einfluß auf das Komplementsystem haben. Prinz und Mitarbeiter (116) berichten über eine signifikante Erhöhung der C3-, IgG- und IgM-Werte bei 25 Probanden nach Gabe von 1 g Ascorbinsäure pro Tag über 75 Tage. Thoma und Holt (154) beobachteten ebenfalls den Einfluß von Ascorbinsäure auf die Komplementaktivität.

Bei dem multifaktorellen Einfluß der Umwelt auf das Komplementsystem könnte z.B. auch das Klima direkt oder indirekt die Synthese oder den Verbrauch von C3 beeinflussen. Über den Einfluß des Klimas auf die Gesamtkomplement- oder C3-Werte ist wenig berichtet worden. Ikonnikow (64) untersuchte den Komplementgehalt im Serum von 80 gesunden Kindern im Alter von 5-12 Jahren, welche unter extrem unterschiedlichen klimatischen Bedingungen lebten, und zwar in Leningrad und Rostow (Kasachstan). Zwischen den beiden untersuchten Kindergruppen wurden keine signifikanten Unterschiede im Komplementgehalt des Serums gefunden.

2.1.2 Die Abhängigkeit der C3b-Konzentration vom Lebensalter

Auch das Alter könnte die Komplementaktivität im Serum beeinflussen. Wie die Ergebnisse unserer Untersuchung bei 349 gesunden Personen zeigen, sind im Sommer bei Männern, die älter als 40 Jahre sind, die C3b-Werte im Vergleich zu Männern unter 40 Jahren signifikant erhöht. Für die Wintermonate unterschieden sich die beiden Altersgruppen nicht signifikant voneinander. Bezüglich der Aktivität des gesamten Komplements bzw. der Komponente C3 sind einige Angaben über die Abhängigkeit vom Alter bei gesunden Personen in der Literatur vorhanden: Hartmann (58) gibt aufgrund seiner Untersuchungen an, daß die Komplementaktivität im höheren Alter, besonders nach dem 60. Lebensjahr, ansteigt. Diese Tendenz machte sich bei einigen Personen schon nach dem 35. Lebensjahr bemerkbar (122). Marucci und Chapman (89) haben bei einem Kollektiv von 1.252 gesunden Personen im Alter von 18-59 Jahren ebenfalls einen mit zunehmendem Alter steigenden Komplementgehalt beobachtet. Einige Autoren führen

den erhöhten Komplementgehalt im Serum älterer Menschen auf die zunehmenden Durchblutungsstörungen und Zunahme des Körpergewichtes im höheren Lebensalter zurück (29; 89; 112). Andere Autoren (51; 158; 159) postulieren, daß die Tatsache der Zunahme des Komplementgehaltes im höheren Lebensalter auf die natürliche Immunisierung durch die Umweltreize zurückzuführen ist.

Furyama und Mitarbeiter (44) stellten fest, daß die C3-Konzentration im Fetus mit dem Stadium der Schwangerschaft anstieg und die C3-Werte der Neugeborenen nur 50% der mütterlichen Konzentration betrugen. Da der kindliche Organismus stärker auf die Umweltreize antwortet, ist auch die C3-Konzentration bei Kindern höher als bei Erwachsenen (83). Es ist bekannt, daß die Anfälligkeit für verschiedene Infektionskrankheiten in den ersten Lebenswochen und in höherem Lebensalter größer ist (39). Diese Beobachtungen bei Menschen und im Tierexperiment weisen darauf hin, daß das immunologische Leistungsvermögen des Organismus einerseits postnatal noch nicht optimal ist und andererseits mit zunehmendem Lebensalter abnimmt. Die Beobachtung, daß der Komplementgehalt mit zunehmendem Alter erhöht ist, könnte auf einer Schwäche des gealterten Immunsystems beruhen, welches nicht mehr mit der erforderlichen Präzision zwischen Eigen- und Fremdantigenen unterscheiden kann, so daß es zu "qualitativen" Störungen und auch zu erhöhten C3b-Werten kommen kann.

2.2 C3b-Werte im Verlauf einer normalen Schwangerschaft

Im Serum von 424 gesunden Frauen wurde im Verlauf einer normalen Schwangerschaft die C3b-Konzentration bestimmt. Hierbei konnten erhöhte C3b-Werte bei Schwangeren im II. Trimenon im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen der gleichen Altersgruppe nachgewiesen werden.

Die Komplementaktivität im Serum von Frauen während einer normalen Schwangerschaft war Thema zahlreicher Untersuchungen (16; 17; 137; 155; 164). Hierbei wurden sowohl unveränderte,

schwankende, erniedrigte als auch erhöhte Werte beschrieben. Thomson und Mitarbeiter (155) berichten von einer normalen hämolytischen Aktivität des gesamten Komplementes (C') bei 157 schwangeren Frauen in allen Stadien der Schwangerschaft. Goldschmidt-Fürstner (164) fand im Serum von Schwangeren große Schwankungen der hämolytischen Komplementaktivität, die sowohl stark erhöht als auch stark vermindert sein konnten. Nach Untersuchungen von Wilken (164) kommt es in der Schwangerschaft zu einer Verminderung der Komplementaktivität (C'), die im I. und II. Trimenon nachweisbar, jedoch erst im III. Trimenon hoch signifikant wird. Soliman und Mitarbeiter (137) beschrieben eine signifikante Erhöhung der hämolytischen Komplementaktivität in Seren von 66 schwangeren Frauen, und Capellani, Bolaffi und Segre (92) berichteten von einer erhöhten hämolytischen Aktivität des Komplementes im Verlauf einer normalen Schwangerschaft, die im II. Trimenon besonders ausgeprägt war.

In eigenen Untersuchungen konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik erhöhte C3b-Werte im II. Trimenon der Schwangerschaft nachgewiesen werden. Die C3b-Werte sind jedoch mit jenen der hämolytischen Aktivität nicht vergleichbar, da mit beiden Methoden verschiedene Größen bestimmt werden, und zwar bei der C3b-Bestimmung das Spaltprodukt der C3-Aktivierung, während bei der Hämolyse die Reaktionen aller Komplementkomponenten von C1 bis C9 ermittelt werden.

Die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Befunde der hämolytischen Komplementaktivität im Verlauf einer normalen Schwangerschaft könnten durch Bestimmungsmethoden und deren Empfindlichkeit bedingt sein. Da am Ablauf der Hämolysereaktion alle Komplementkomponenten, die in einer bestimmten Reihenfolge reagieren, beteiligt sind, führen schon minimale Modifikationen der Methode zu unterschiedlichen Ergebnissen (61; 108).

Marghescu (86) stellte fest, daß zwischen der hämolytischen Aktivität des gesamten Komplementes und der C3c-Konzentration

im Serum eine positive Korrelation besteht. Bei einem normalen Aktivierungsvorgang ist solch eine Korrelation auch zwischen den C3b-Werten und der gesamten hämolytischen Aktivität denkbar, d.h. falls die C3-Aktivierung nicht durch zusätzliche Einwirkung von verschiedenen Substanzen, wie z.B. von Medikamenten, Umweltschadstoffen, Hormonen oder anderen Komplementaktivatoren, beeinflußt wird.

Eine Erhöhung der Komplementaktivität bzw. der C3b-Werte in den ersten beiden Trimenen kann man auf "den allgemeinen Streß" einer Schwangerschaft besonders im ersten Trimenon auf die entzündlichen Reaktionen des Gewebes bei der Implantation des befruchteten Eies zurückführen (137). Nach Burstein und Blumenthal (16) treten starke Gefäßveränderungen und lymphatische Infiltrationen in der Dezidua im I. Trimenon der Schwangerschaft auf. Es ist bekannt, daß entzündliche Reaktionen zu einer verstärkten Aktivierung des Komplementes und somit zur C3-Spaltung in C3a und C3b (16; 42; 124) führen.

Eine andere Deutungsmöglichkeit für die Erhöhung der Komplementaktivität wäre der Einfluß hormoneller Faktoren (80). Zu Beginn der Schwangerschaft, wenn sich die Dezidua gebildet hat, produzieren dessen Zellen größere Mengen an Choriongonadotropin. Im 3. Schwangerschaftsmonat kommt es zu einer hormonellen Umstellung im Körper; die Bildung von Choriongonadotropin nimmt rapide ab und die Produktion von Gestagenen und Oestrogenen steigt an. Diese Veränderungen wirken auf verschiedene andere Faktoren; z.B. bleibt die durch Einfluß von Progesteron höhere Körpertemperatur bis ca. II. Trimenon bestehen (119a). Diese hormonellen Einflüsse könnten die Ursache für die erhöhten C3b-Werte im II. Trimenon sein.

Auch die von verschiedenen Autoren im Tierexperiment erhobenen Befunde über den Komplementgehalt während einer normal verlaufenden Trächtigkeit sind widersprüchlich: Chichella (zit. nach Wilken (164)) stellte bei trächtigen Meerschweinchen eine Komplementzunahme fest, Boulanger u. Mitarb. (zit. nach 164) fanden dagegen eine Verminderung. Sysojew und Grigorow (149)

beobachteten bei trächtigen Meerschweinchen am Anfang der Trächtigkeit eine Verminderung, später jedoch bis zur Geburt eine Zunahme bis zur Verdoppelung der Komplementkonzentration.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die erhöhten C3b-Werte im II. Trimenon der Schwangerschaft für eine erhöhte C3-Aktivierung sprechen. Allerdings sind die Ursachen und Mechanismen dieses Vorganges zur Zeit noch ungeklärt. Einen Zusammenhang der C3-Aktivität bei schwangeren Frauen mit der Blutgruppenzugehörigkeit und insbesondere dem Rh-Faktor haben wir bei unseren Untersuchungen nicht festgestellt.

Marucci und Chapman (89) untersuchten die hämolytische Aktivität des Komplements in Seren von 1258 gesunden Blutspendern und haben keinen Zusammenhang zwischen der hämolytischen Aktivität und der Blutgruppenzugehörigkeit, weder bei Männern noch bei Frauen, nachgewiesen. Auch Soliman und Mitarbeiter (137) fanden keine Unterschiede des Komplementspiegels in Abhängigkeit von den Blutgruppen.

2.3 Vergleich der C3b-Werte von Personen aus Gebieten mit unterschiedlich starker Luftverunreinigung

Nach den C3b-Bestimmungen bei gesunden Probanden und schwangeren Frauen wurde mit Hilfe der beschriebenen Methode in Seren eines dritten Probandenkollektivs, und zwar bei 60jährigen Männern aus Gebieten mit unterschiedlicher Luftverunreinigung, C3b-Bestimmungen durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die C3b-Konzentration vielleicht von der Luftverunreinigung beeinflußt wird, da Schadstoffe der Umwelt die Gesundheit des Menschen beeinträchtigen und daher zu einer Aktivierung des Immunsystems führen können (34; 130). Es wird angenommen, daß Veränderungen von immunologischen Reaktionen bereits sehr früh nach Schadstoffeinwirkung auftreten (131), jedoch ist es schwierig, den Einfluß der Luftverunreinigungen auf den Menschen zu definieren und von anderen Umwelteinwirkungen zu trennen (34). Trotz der multifaktoriellen Genese immunologischer Reaktionen wurde jedoch der Versuch unter-

nommen, einen Zusammenhang zwischen Schadstoffkonzentrationen der Luft und C3-Konzentrationen der Seren als Parameter des Immunsystems zu entdecken.

Bei den im Rahmen der von Mitarbeitern des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf in den Jahren von 1978 bis 1982 im Auftrag des Ministeriums für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführten epidemiologischen Studien zur Erstellung des Luftreinhalteplans NW wurde neben zahlreichen anderen Parametern die C3c-Konzentration im Serum mittels der radialen Immundiffusion nach Mancini (85) gemessen. Die Untersuchungen an großen Kollektiven, auf die jeweils das gesamte Spektrum der Luftschadstoffe einwirkt, zeigten eine eindeutige Erhöhung der C3-Serumkonzentration bei Probanden aus belasteten Gebieten im Vergleich zu Werten von Bewohnern der sogenannten Reinluftgebiete (147).

In der Literatur ist über den Einfluß von einzelnen Schadstoffen der Luftverunreinigung bzw. des gesamten Spektrums auf die C'- oder C3-Konzentration im Serum wenig berichtet worden. Erniedrigte C3-Werte wurden bei Personen unter Einfluß von Blei (40; 119), Stickoxiden (78) sowie Salz- und Schwefelsäuredämpfen (128) beschrieben. Die Verminderung der C3-Konzentrationen unter Bleibelastung konnten auch im Tierversuch bei Mäusen und Ratten bestätigt werden (144).

In der epidemiologischen Studie 1978 wiesen Bergleute erhöhte C3c-Werte im Vergleich mit den nicht im Bergbau tätigen Männern derselben Wohngebiete auf (MAGS). Um die C3c-Erhöhung bei Bergleuten, die quarzhaltigen Grubenstäuben ausgesetzt sind, näher interpretieren zu können, wurde in Tierversuchen der Einfluß von Quarz nach i.p. Applikation auf die C3-Konzentration untersucht. Hierbei zeigte sich eine Erhöhung der C3-Werte. Die Mechanismen der C3-Erhöhung sind nicht geklärt; vielleicht wirken die Quarzteilchen stimulierend auf die Makrophagen, die auch C3 synthetisieren (145; 146).

Vergleicht man die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse der C3b-Bestimmung mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik mit denen der C3c-Bestimmung mittels der radialen Immundiffusion, wird deutlich, daß es sich hierbei um die Bestimmung von unterschiedlichen C3-Aktivierungsprodukten handelt: Während die C3b-Werte, des Spaltproduktes der C3-Aktivierung, unter Einfluß von Luftschadstoffen bei den Probanden aus Duisburg signifikant höher lagen, konnte dieser Effekt bei der Bestimmung von C3c, einem C3-Abbauprodukt, in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Die erhöhten C3b-Werte könnten auf einen Zusammenhang zwischen der Einwirkung von Luftschadstoffen, die zu einer erhöhten C3-Aktivierung auf dem alternativen Wege führen, und zugleich auf einen sekundären Verbrauch des C3 hinweisen: Das aktive C3b kann sich an Akzeptoren binden und weiter in der C-Aktivierungskaskade reagieren oder bei der Bildung der C3-Konvertase des alternativen Weges beteiligt werden. Hierbei wird das C3b in immunologischen Reaktionen, wie z.B. bei der Bildung von AgAk-Komplexen, der Cytolyse oder der Opsonierung in vivo verbraucht und es kann im gealterten Serum als Abbauprodukt C3c mit Hilfe der radialen Immundiffusion nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen:

1. Mit der hier entwickelten Immunfluoreszenzmethode kann man C3b, das aktive Spaltprodukt der C3-Aktivierung und damit den Aktivierungsvorgang selbst in vivo quantitativ erfassen.
2. Diese Methode ist auch geeignet zur Anwendung bei großen Kollektiven von Probanden.

VI. Zusammenfassung

In der Aktivierungskaskade auf dem klassischen und alternativen Wege des Komplementes ist das Spaltprodukt C3b von großer Bedeutung. Bisher liegen jedoch keine quantitativen C3b-Bestimmungsmethoden vor.

In dieser Arbeit wird ein Modell zur quantitativen Bestimmung von C3b mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik beschrieben. Als Substrat für die Bindung von C3b wurde ein Antigen-Antikörper-Komplex im Glomerulum der Rattenniere nach Injektion von Nephrotoxin gewählt. Das C3b lagert sich an den AgAk-Komplex an, und nach einer Inkubation mit FITC-konjugiertem Anti C3-Serum entsteht ein markierter Komplex. Die Fluoreszenzintensität dieses Komplexes konnte mit Hilfe eines entsprechend ausgerüsteten Mikroskop-Photometers quantitativ in relativen Spannungswerten erfaßt werden.

Die Methode der C3b-Bestimmung wurde unter verschiedenen Bedingungen kritisch überprüft. Hierbei zeigte sich, daß die Lagerungszeit und -temperatur der Nierenschnitte und Seren einen wesentlichen Einfluß auf die C3b-Werte hatten. Die besten Ergebnisse konnten in frischen Seren oder bei Lagerung von -70°C bis drei Monate erreicht werden.

Nachdem sich gezeigt hat, daß die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Immunfluoreszenz-Reaktion zum C3b-Nachweis im Serum geeignet ist, wurden mit dieser Methode in 349 Seren gesunder Personen die C3b-Werte bestimmt. In diesen Untersuchungen konnte eine jahreszeitliche Abhängigkeit der C3b-Werte festgestellt werden, wobei die Meßwerte der im Sommer/Herbst untersuchten Personen höher lagen als bei denen im Winter/Frühjahr.

Eine Korrelation zwischen den C3b-Werten und dem Alter der Probanden bis 40 Jahre bestand nicht; erst nach dem 40. Lebensjahr wurde eine Erhöhung der C3b-Werte beobachtet.

Ein Einfluß vom Geschlecht auf die C3b-Werte konnte nicht nachgewiesen werden.

In den Seren von 424 schwangeren Frauen wurden signifikant erhöhte C3b-Werte im II. Trimenon (Sommer) im Vergleich zu den nicht schwangeren Frauen gemessen.

In 656 Seren von 60jährigen Männern aus Gebieten mit unterschiedlich starker Luftverunreinigung (Duisburg und Gummersbach) wurden bei den Probanden aus Duisburg sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern signifikant höhere C3b-Werte im Vergleich mit Probanden aus Gummersbach festgestellt.

Wie die Ergebnisse der Untersuchungen über die C3b-Konzentration in frischen humanen Seren zeigen, besteht die Möglichkeit, mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik das aktive bindungsfähige Spaltprodukt der dritten Komplementkomponente quantitativ zu bestimmen.

Diese Methode kann an größeren Personenkollektiven angewandt werden.

Literaturverzeichnis

1. Abramson, N., C.A. Alper, P.J. Lachmann, F.S. Rosen, and J.H. Jandl: Deficiency of C3 inactivator in man.
J. Immunol. 19 (1971), 107-111.

2. Alper, C.A.: Human C'3 evidence for the liver as the primary site of synthesis.
Science 163 (1968), 286-288.

3. Alper, C.A., R.P. Propp, M.R. Klemperer, and F.S. Rosen: Inherited deficiency of the third component of human complement (C3).
J.Clin.Invest. 48 (1969), 553-557.

4. Alper, C.A., N. Abramson, R.B. Johnston, J.H. Jandl, and F.S. Rosen: Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement-mediated functions and of the third component of complement (C3).
N.Engl.J.Med. 282 (1970), 349-354.

5. Alper, C.A., H.R. Colten, F.S. Rosen, A.R. Rabson, G.M. Macnab, and J.S.S. Gear: Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infections.
Lancet II (1972), 1179-1181.

6. Arisz, L., J.R.H. Brentjens, G.K. van der Hem, and E. Mandema: Clinical value of serum B_{1A}- and B_{1E}-globulin levels in adult patients with renal disease.
Acta Med.Scand. 192 (1972), 255-261.

7. Atkinson, J.P., and M.M. Frank: Complement.
In: Clinical immunology. Ed. by G.H.W. Parker. - London, Philadelphia: W.B. Saunders Comp. 1980, pp. 219-271.

8. Behring-Institut: Partigen-Immundiffusionsplatten.
Behringwerke AG, Med. Information und Vertrieb - Frankfurt/M. 1974.

9. Beisel, R.W.: Single nutrients and immunity.
Amer.J.clin.Nutr. 35 (1982), 417-468.

10. Berger, J.: Quantitative Immunelektrophorese-Methoden.
MTA-Journal 2 (1980), 34-40.

11. Bläker, F., K. Fischer und P. Witte: Quantitative Komplement-analysen (C'3) mit der radialen Immundiffusion bei Erkrankungen mit gestörter Immunitätslage.
Dtsch.med.Wschr. 94 (1969), 1978-1982.

12. Bitter-Suermann, D.: Aktivierung des Komplementsystems - Ein Monopol des Immunkomplexes?
Klin.Wschr. 50 (1972), 277-286.

13. Bitter-Suermann, D.: Die Funktionseinheit Makrophage - Komplement.
Verh.Dtsch.Ges.Path. 64 (1980), 63-76.

14. Bordet, J.: Sur l'agglutination et la dessolution des globules rouges par le serum d'animaux injecties de sang défibriné.
Ann.Inst.Pasteur 12 (1898), 688.

15. Brandslund, I., H.C. Siersted, S.E. Svehag, and B. Teisner: Double-decker rocket immunoelectrophoresis for direct quantitation of complement C3 split products with C3d specificities in plasma.
J. Immunol.Methods 44 (1981), 63-71.

16. Burstein, R.H., and T.H. Blumenthal: Immune reactions of normal pregnancy.
Am.J.Obstet.Gynecol 104 (1969), 671-678.

17. Byles, A.B.: Problems of immunology pregnancy.
East Afr.Med.J. 45 (1968), 423-428.

18. Caputo, M.J.: Clinical evaluation of serumprotein quantitation by a new laser nephelometer.
IV. Coll. Protides of biol. fluids Brugge 1976, 1-3.

19. Carswell, F., and R.W. Logan: Plasma β_1C-β_1A globulins and immunoglobulins in coeliac disease.
Arch.Dis.Childh. 48 (1973), 587-589.

20. Chachaj, W., M. Szott, and W. Falowska-Adamczyk: The determination of β_1 C-globulin (C'3 component of complement) by immunodiffusion in various clinical states of bronchial asthma.

Pol.Med.J. 11 (1972), 320-325.

21. Chaplin, H., Jr., J. Freedman, A. Massey, and M.C. Monroe: Characterization of red blood cells strongly coated in vitro by C3 via the alternative pathway.

Transfusion 20 (1980), 256-262.

22. Clark, R.A., and R. Klebanoff: Role of the classical and alternative complement pathway in chemotaxis and opsonisation.

J. Immunol. 120 (1978), 1102-1107.

23. Colten, H.R.: Ontogeny of the human complement system: in vitro biosynthesis of individual complement component by fetal tissues.

J.Clin.Invest. 51 (1972), 725-730.

24. Colten, H.R., C.A. Alper, and F.S. Rosen: Genetic and biosynthesis of complement proteins.

N.Engl.J.Med. 12 (1981), 653-656.

25. Coons, A.H., H.J. Creech, and R.N. Jones: Immunological properties of an antibody.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 47 (1941), 200-202.

26. Cooper, N.R.: The complement system.

In: Basic and clinical immunology. Ed. by H.H. Fudenberg et al. -

27. Coppola, E.D., and G.R. Villegas: Serum complement: Changes after skin grafting in guinea pigs.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125 (1967), 1071-1074.

28. Cordis Laboratories, Inc., Miami, Florida, USA: The complement system.
Workshop onhaemolytic assays, Köln, 6.5.1983.

29. D'Alessandro Gandolfo, L., and G. Topi: Values of the IgG, IgA, IgM immunoglobulins and of the fraction C'3 of the complement in 200 normal subjects.
Boll.Ist.Sieroter.Milan. 52 (1973), 405-409.

30. DaSilva, W.: Complement.
In: Fundamentals of immunology. Ed. by O.G. Bier et al. - New York: Springer-Verlag 1981, pp. 111-130.

30a. Day, N.K., and R.A. Good (Eds.): Biological amplification systems in immunology. - New York, London: Plenum Medical Book Comp. (1977), 325 pp.
= Comprehensive Immunology, Vol. 2.

31. Deaton, C.D., K.W. Maxwell, R.S. Smith, and R.L. Creveling: Use of laser nephelometry in the measurement of serum proteins.
Clin.Chem. 22 (1976), 1-6.

32. DeVecchi, A., G. Montagnino, L. Massavo, A. Constantino, P.L. Bencini, and A. Tarantino: Comparison between immunofixation and crossed immunoelectrophoresis for detection of C3 activation products.
Clin.Chim.Acta 97 (1979), 27-32.

33. Dierich, M.P.: Complement receptors on lymphocytes.
J.Cancer Res.clin.Oncol. 101 (1981), 65-67.

34. Dolgner, R.: Störvariablen bei der Ermittlung des Einflusses von Luftverunreinigungen auf die Gesundheit des Menschen.
In: Umwelthygiene. Hrsg.v.d.Ges.z.Förderung d.Lufthygiene und Silikoseforschung e.V., Düsseldorf. - Essen: Girardet (1980), S. 135-151.
= Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Jahresbericht 1979, Bd. 12.

35. Dubos, R.J.: Biochemical determinants of microbial diseases.
Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1954.

36. Eddy, T.P., A.L. Stock, and E.F. Wheeler: Nutritional and environmental studies on an ocean-going oil tanker. 3. Energy balances and physique.
Brit.J.industr.Med. 28 (1971), 330-341.

37. Ehrlich, P. und J. Morgenroth: Zur Theorie der Lysinwirkung.
Berl.klin.Wschr. 36 (1899), 6.

38. Ellmann, L., J. Green, and M. Frank: Genetically controlled total deficiency of the fourth component of complement in the guinea pig.
Science 74 (1970), 170-178.

39. Emmerling, P. und H. Finger: Immunologisches Reaktionsvermögen im höheren Lebensalter.
Immun.Infekt. 1 (1973), 26-32.

40. Ewers, U., R. Stiller-Winkler, and H. Idel: Serum immunoglobulin, complement C3, and salivary IgA levels in lead workers.
Environ.Res. 29 (1982), 351-357.

41. Feinstein, A., and A.J. Rowe: Molecular mechanism of formation of an antigen-antibody complex.
Nature 205 (1965), 147-149.

42. Fine, D.P. (Ed.): Complement and infectious diseases. - Boca Raton, Florida: CRC Press (1981), 157 pp.

43. Finlayson, N.D.C., K. Krohn, M.H. Fauconnet, and K.E. Anderson Significance of serum complement levels in chronic liver disease.
Gastroenterology 63 (1972), 653-659.

44. Furuyama, M., H. Yoshioka, and Ch. Oguni: Development of $ß_{1C}$-globulin during fetal life in comparison with IgG and IgM.
Helv.Paediatr.Acta 26 (1971), 220-225.

45. Gierhake, F.W., D. Plock-Kömnick, E. Torrau, K. Heide und G. Schaper: Postoperative Verminderung der Immunglobuline und des Komplements und ihre mögliche Bedeutung für infektiöse Komplikationen.
Langenbecks Arch.Chir., Suppl. (1973), 385-389.

46. Glovsky, M.M., G. Opelz, and P.J. Terasahi: Genetic, opsonic, and bactericidal studies in a C2 deficient family.
Clin.Res. 24 (1976), 327-329.

47. Golan, M.D. und M. Loos: Abwehrmechanismen bei Infektionserkrankungen (IV): Das Komplementsystem.
mta-journal 2 (1980), 474-479.

48. Gordon, P.: Complement activity in the eviscerate rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 89 (1955), 607-608.

49. Grabar, P. et C.A. Williams: Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophoretiques et immunochimique d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
Biochim.Biophys.Acta 10 (1953), 193.

50. Grieco, M.H., J.D. Capra, and H. Paderon: Reduced serum beta 1c/1a globulin levels in extrarenal disease.
Am.J.Med. 51 (1971), 340-345.

51. Grob, P.J. und H. Jemelka: die ß1A-Bestimmung in der Klinik.
Schweiz.med.Wschr. 101 (1971), 223-228.

52. Grzybek-Hryncewicz, K., and Z. Jelewska-Kaniakowa: Serum complement titers in viral hepatitis.
Arch.Immunol.Ther.Exp. (Warsz.) 20 (1972), 189-192.

53. Gutzeit D. und J. Oehme: Serum-Komplement (Fraktion C_3) bei chronischer Pyelonephritis im Kindesalter.
Klin.Wschr. 50 (1972), 845-846.

54. Hadding, U.: Das Komplementsystem.
Medizin in unserer Zeit 4 (1980), 23-32.

55. Hadding, U. und D. Bitter-Suermann: Das Komplementsystem und seine Funktionen.
Dtsch.Ärztebl. 13 (1974), 932-938.

56. Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie. - 3. Aufl. Stuttgart: Thieme 1961.

57. Hallauer, J.F., R. Stiller-Winkler, and A. Brockhaus: Alteration of the immune status in mice and rats exposed to lead.

In: Heavy metals in the environment, Heidelberg, September 1983. International Conference. Vol. 2. - Edinburgh: CEP Commission of the European Communities Consultants Ltd. 1983, pp. 710-713.

58. Hartmann, J.: Complement determination. 2. Determination of heamolytic complement activity in human sera as a function of age.

Acta Pathol.Microbiol.Scand. 42 (1958), 164-172.

59. Herzlinger, G.A., D.H. Bing, R. Stein, and D. Cumming: Quantitative measurement of C3 activation at polymer surfaces.

Blood 57 (1981), 764-770.

60. Huber, H., D. Pastner und F. Gabl.: Laboratoriumsdiagnose hämatologischer und immunologischer Erkrankungen. - Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1972.

61. Hudson, L., and F.C. Hay: Antibody effector systems.

In: Practical immunology. Ed. by L. Hudson and F.C. Hay. - Oxford, London: Blackwell Sci.Publ. 1980, pp. 142-155.

62. Hugli, T.E., and H.J. Müller-Eberhard: Anaphylatoxins: C3a and C5a.

Adv.Immunol. 26 (1978), 1-53.

63. Humphrey, J.H., and R.G. White: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Deutsche Übersetzung vom Max-Planck-Institut für Immunologie, Freiburg, Hrsg. E. Macher. 3. Aufl. - Stuttgart: Thieme 1971.

64. Ikonnikow, I.W.: Titr komplementa i rewmatoidnyj faktor u zdorowyh djetjej w wozrastnom i klimato-gjeografi-tscheskom aspektah. (Age an climatic-geographic aspects of complement and rheumatoid factor in healthy children. Russ.)

Lab.Delo 2 (1972), 440-441.

65. Iseman, E., I.C. Kells, R. Cooper, J. Müller-Eberhard, and K.M. Pangburn: Nuclephilic modification of human complement protein C3: Correlation of conformational changes with aquisition of C3b- like functional properties.

Biochemistry 20 (1981), 4458-4467.

66. Janatova, J., B.F. Tack, and W.J. Prahl: Third component of human complement: Structural requirements for its function.

Biochemistry 19 (1980), 4479-4485.

67. Johnson, A.M., C.A. Alper, F.S. Rosen, and J.M. Crag: Immunofluorescent hepatic localization of complement proteins: evidence for biosynthetic defect in heredietary angioneurotic edema (Hane).

J.clin.Invest. 50: 50a (abstract) 1971 b.

68. Kabat, E.A.: Einführung in die Immunchemie und Immunologie. Deutsche Übersetzung von K. Jann und E. Rüde. Heidelberger Taschenbücher Nr. 79. - Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1971.

69. Kallestad Laboratories USA: Quantiplate: Total complement test kit or the quantitation of total complement levels in human serum by radial diffusion (1978).

70. Kay, A.B., G.D. Bacon, B.A. Mercer, H. Simpson, and J.W.Crofton: Complement components and IgE in bronchial asthma.

Lancet I (1974), 916-920.

71. Klein, P.: Faktorenanalyse der dritten Komplementkomponente.

Immunchemie 15 (1965), 330-344.

72. Klein, P.: Die lytische Funktion des Komplements und ihre materiellen Träger.

Acta Histochem. 7 (Suppl.) (1965), 33-42.

73. Klein, P.: Struktur und Funktion des Komplementsystems.

Bibl. Haematologica 27 (1967), 62-80.

74. Klein, P. und A. Colli: Herstellung und Auswertung von "Anti-Komplement".

Z.Hyg. 147 (1961), 201-212.

75. Klein, P.G., and P.M. Burkholder: Studies on the antigenic properties of complement. I. Demonstration of agglutinating antibodies against guinea-pig complement fixed on sensitized sheep erythrocytes.

J.exp.Med. 111 (1960), 93-106.

76. Klein, P.G., and H.J. Wellensiek: Multiple nature of the third component guinea-pig complement. I. Separation and characterization of three factors a, b and c, essential for haemolysis.

Immunology 8 (1965), 590-603.

77. Knapp, W.: Interactions of the third component of complement (C3) with cross-linked dextran. I. Binding of C3 from normal human serum to cross-linked dextran as defined by quantitative immunofluorescence.

Z.Immun.Forsch. 148 (1974), 231-234.

78. Kosmider, St., A. Misiewicz, E. Felus, M. Drozdz und K. Ludyga: Experimentelle und klinische Untersuchungen über den Einfluß der Stickstoffoxide auf die Immunität.

Int.Arch.Arbeitsmed. 31 (1973), 9-23.

79. Kretschmer, V., and Ch. Mueller-Eckardt: Autoimmune hemolytic anemias. II. Immunoglobulins and ß1A-globulin in the serum with special regard to the immunochemical type of autoantibodies anf the course of the disease.

Blut 25 (1972), 159-168.

80. Kueppers, F. und K.H. Schulz: Untersuchungen von Komplementfaktoren bei hereditärem Quincke-Ödem.

Arch.Dermatol.Res. 244 (1972), 560-563.

81. Lanzer, G.: Das Komplementsystem.

Lab.med. 5: 157 (1981), 158-166.

82. Laurell, C.B.: Electrophoretic and electro-immunochemical analysis od proteins.

Scand.J.clin.Lab.Invest. 29, (Suppl. 124) (1972), 21-37.

83. Lennert, K.A., M. Kollmar und H. Hupe: Verhalten der Immunglobuline G, A und M, des $ß_1$-C-Globulins, des α2-Antitrypins und des α1-Makroglobulins bei Kindern vor und nach operativen Eingriffen.

Monatsschr.Kinderheilkd. 121 (1973), 151-154.

84. Loos, M.: Humorale Abwehrmechanismen bei Infektionen.
Rhein.Ärztebl. 9 (1975), 253-259.

85. Mancini, G., A.O. Carbonara, and J.F. Heremans: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2 (1965), 235-254.

86. Marghescu, S.: Über die quantitative Bestimmung des Komplements mittels Immundiffusion.
Klin.Wschr. 46 (1968), 991-995.

87. Marsteller, H.J. und D. Ricken: Probleme der "Komplement"-(β_{1A})-Bestimmung in der Klinik.
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 78 (1972), 833-836.

88. Martini, H.: Neue Begriffe der Entzündung.
Med.Klin. 68 (1973), 697-700.

89. Marucci, A.A., and O.D. Chapman: Complement activity in sera from normal adult blood donors: Its relation to blood group, Rh(D)type, sex, age and weight.
Transfusion 4 (1964), 39-44.

90. Masugi, M.: Über das Wesen der spezifischen Veränderungen der Niere und der Leber durch das Nephrotoxin bzw. Hepatotoxin. Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese der Glomerulonephritis und der eklamptischen Lebererkrankung.
Beitr.pathol.Anat. 91 (1933), 82-112.

91. Mayer, M.M.: Complement.
In: Experimental Immunochemistry. Ed. by E.A. Kabat and M.M. Mayer. 2. Aufl. - Springfield, Ill.: Thomas 1961, pp.133-240.

92. Meiss, L., V. Djandji, M. Raute und W. Kühn: Zur Therapie des Mammakarzinoms. Chirurgische, radiologische und hormonelle Therapie bei einer Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom. Klinischer Verlauf unter Berücksichtigung präterminaler Immunglobulin- und Komplementveränderungen.
Fortschr.Med. 92 (1974), 615-616.

93. Miller, G.W., and V. Nussenzweig: A new complement function: solubilization of antigen-antibody aggregates.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72 (1975), 418-422.

94. Milman, M.S., and A.I. Litwin: Koprjedjeljeniju kompljem-jentaroj aktiwnosti synowotki krowi. (Determination of the complement activity. Russ.)
Lab.Delo 10 (1973), 604-606.

95. Müller-Eberhard, H.J.: Chemie der Komplement-Faktoren.
Immunchemie 15 (1965), 309-329.

96. Müller-Eberhard, H.J.: Veränderungen des Komplement-Systems und ihre Auswirkungen: Heutiger Stand der Komplementforschung.
Tempo Med. 1 (1980), 22-29.

97. Müller-Eberhard, H.J.: Was wissen wir heute über das Komplementsystem?
Klin.J. 1 (1981), 26-37.

98. Moore, H.D.: Complementary and opsonic functions in their relation of immunity. A study of serum of guinea pigs naturally deficient in complement.
J. Immunol. 4 (1919), 425-429.

99. Nicholson, A., V. Brade, G.D. Lee, H.S. Shin, and M.M. Mayer: Kinetic studies of the formation of the properdin system enzymes on zymosan: Evidence that nascent C3b controls the rate of assembly.
J. Immunol. 112 (1974), 1115-1123.

100. Niederländische Gesellschaft für Immunologie: Komplement-System.
In: Einführung in die Immunologie. UNI-Taschenbücher 138. - Stuttgart: G. Fischer Verlag 1972.

101. Nilsson, U.R., M.E. Miller, and S. Wyman: A functional abnormality of the fifth component of complement (C5) from human serum of individuals with a familial opsonic defect.
J. Immunol. 112 (1974), 1164-1176.

102. Nymand, G.: Complement-fixing and lymphocytotoxic antibodies in serum of pregnant women at delivery.
Vox.Sang. 27 (1974), 322-337.

103. Odink, K., G. Fey, K. Wiebauer, and H. Diggelmann: Mouse complement components C3 und C4.
J.Biol.Chem. 256 (1981), 1453-1458.

104. Ohlenschläger, G., J. Berger und W. Depner (Eds.): Synopsis der Elektroporesetechniken. - Darmstadt: G.I.T. Verlag E. Giebeler 1980.

105. Okada, H.: Two complement receptors on cell membrane.
Jap.J.Exp.Med. 44 (1974), 261-262.

106. Okada, H., and N. Okada: Complement receptors on cell membrane. II. Separation from mouse plasma of two essential factors for complement receptors on cell membranes.
Jap.J.Exp.Med. 44 (1974), 301-310.

107. Opferkuch, W., and P.G. Klein: Studies on the antigenic properties of complement: III. Specific inactivation on cell-fixed components of guinea pig complement by anti-complement.
Immunology 7 (1964), 261-272.

108. Opferkuch, W. und U. Schmidt: Komplementsystem.
In: Praxis der Immunologie. Hrsg.
Stuttgart: G. Thieme Verlag 1976, S.

109. Opferkuch, W.: Die klinische Bedeutung des Komplementsystems.
Imm.Inf. 5 (1977), 5-10.

110. Oudin, J.: Methode d'analyse immunochimique par precipitation specifique en milieu gelific.
C.R. Seances Acad.Sci. 222 (1946), 115-116.

111. Ouchterlony, Ö.: Gel-Diffusion techniques.
Immunchemie 15 (1965), 13-35.

112. Perlick, E. und M. Tost: Untersuchungen über die hämolytische Komplementaktivität bei Erkrankungen des arteriellen Gefäßsystems.
Dtsch.Arch.klin.Med. 200 (1953), 616-628.

113. Pillemer, L., L. Blum, I.H. Lepow, O.A. Ross, E.W. Todd, and A.C. Wardlaw: The properdin system and immunity: I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena.
Science 120 (1954), 279.

114. Polley, M.J., and A.G. Bearn: Genetic aspects of diseases of complement: an explosion.
Am.J.Med. 58 (1975), 105-111.

115. Prall, R.H., and F.S. Kantor: Serum complement in eclamptogenic toxemia.
Am.J.Obstet.Gynecol. 95 (1966), 530-533.

116. Prinz, W., R. Bortz, B. Bregin, and M. Hersch: The effect of ascorbic acid supplementation on some parametyers of the human immunologic defence system.
Int.J.Vitam.Nutr.Res. 47 (1977), 248-257.

117. Ramadori, G., H. Rasokat, R. Burger, K.H. Meyer zum Büschenfelde, and D. Bitter-Suermann: Quantitative measurement of complement components produced by purified hepatocytes.
Immunology 164 (1983), 3-4.

118. Reid, K.B., and R.R. Porter: The proteolytic activation systems of complement.
Ann.Rev.Biochem. 50 (1981), 433-464.

119. Reigart, J.R., and C.D. Graber: Evaluation of the humoral immune response of children with low level lead exposure.
Bull.Environ.Contam.Toxicol. 16 (1976), 112-117.

119a. Rein, H. und M. Schneider: Drüsen mit innerer Sekretion.
In: Physiologie des Menschen. Hrsg. H. Rein und H. Schneider. - Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1960, S. 350-419.

120. Rice, C.: Relative effects of various agents on complement and antibody production.
J. Immunol. 73 (1954), 375-382.

121. Rittner, Ch., and B. Rittner: Qualitative and quantitative comparison of C3 variant sera during the Bonn Workshop.
Vox.Sang. 25 (1973), 21-27.

122. Roberts-Thomson, I.C., S. Whittingham, U. Younchaiyud, and I.R. Mackay: Ageing, immune response and mortality.
Lancet II (1974), 368-370.

123. Roit, J. (Ed.): Leitfaden der Immunologie. - Darmstadt: Verlag Dr. D. Steinkopff 1977.

124. Rother, K., U. Hadding und G. Till (Hrsg.): Komplement: Biochemie und Pathologie. - Darmstadt: D. Steinkopff-Verl.1974.

125. Ruddy, S., and H.R. Colten: Rheumatoid arthritis: biosynthesis of complement proteins by synovial tissue.
N.Engl.J.Med. 290 (1974), 1284-1288.

126. Ruddy, S., I. Gigli, and K.F. Austen: The complement system of man.
N.Engl.J.Med. 287 (1972), 642-646.

127. Scheidegger, J.J.: Une micro-méthode de l-immunoélectrophorése.
Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 7 (1955), 103.

128. Scheller, S., A. Posz und J. Tustanowski: Der Einfluß einiger industrieller Faktoren auf das Verhalten von Mechanismen der unspezifischen Immunität und der Immunglobuline im Speichel.
Zbl.Arbeitsmed. 1 (1977), 11-16.

129. Scheurlen, P.G.: Differentialdiagnostische Bedeutung von Serumeinweißuntersuchungen.
Internist 2 (1968), 56-63.

130. Schlipköter, H.-W.: Lufthygienische Gesichtspunkte für eine Soll-Struktur der städtebaulichen Ordnung.

VDI-Kolloquium "Reinhaltung der Luft in großen Städten" vom 8.-10.12.1982 in Berlin. Vortrag.

131. Schlipköter, H.-W., und R. Dolgner: Luftverunreinigung und körpereigene Abwehr.

Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.B 172 (1981), 299-311.

132. Schlipköter, H.-W. und N. de Ruiter: Quantitative Bestimmung der Fluorescenzintensität mit Hilfe des UMSP I bei fluorescenzserologischen Untersuchungen über den Verbleib von Nephrotoxin in Rattennieren.

Z.Versuchstierk. 12 (1970), 261-264.

133. Schlipköter, H.-W., P. Feyerabend, K. Koenen und H. Idel: Tumorcharakteristische Antigene in Bronchialkarzinomen (2.Teil). Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität in histologischen Schnitten.

Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. B 159 (1974), 526-538.

134. Schorlemmer, H.-U.: Das Komplement-System.

Die gelben Hefte XXII (1982), 49-59.

135. Simko, I., L. Surjan und G. Füst: C'3-Komplement (β_{1c}-Globulin)-Konzentration bei der primär chronischen Bronchitis im Säuglings- und Kleinkindesalter.

Acta Paediatr.Acad.Sci.Hung. 13 (1972), 25-32.

136. Slopek, S.: Immunologia praktyczna. (Praktische Immunologie. Poln.). - Warszawa: Panstwowy Zaklad Wydawnictw Lekarskich 1970.

137. Soliman, M.D.E., H.E. Fadel, and M.M. El-Mehairy: Serum complement activity during normal pregnancy.

Int.J.Gynecol.Obstet. 9 (1971), 181-184.

138. Spath, P., F. Gabl und H. Huber: Das quantitative Verhalten einzelner Serumeiweißfraktionen bei chronischer Urämie. II. Teil: Serumkonzentrationen der Immunglobuline und der 3. Komplementkomponente (C3) bei Patienten mit Urämie.

Wien.Klin.Wschr. 84 (1972), 590-598.

139. Sprenger, E. und N. Böhm: Qualitative und quantitative Fluoreszenzmikrospektrographie mit dem Leitz-Mikrospektrographen.

Histochemie 25 (1971), 177-181.

140. Steffen, C. (Hrsg.): Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie. - Stuttgart: Thieme 1960.

141. Stein, G., A. Stelzner und E. Tanner: Zum Verhalten des Gesamt-Serum-Komplements bei Nierenerkrankungen und Lupus erythematodes disseminatus.

Z. Ges.Inn.Med. 28 (1973), 469-476.

142. Stein, H., E. Grosskopf, and E. Lennert: Demonstration of C3 receptors on frozen sections of normal lymphoid tissue and malignant lymphomas using various EAC complexes.

Blut 41 (1980), 101-118.

143. Stiller-Winkler, R.: Eigene Untersuchungen, 1981.

144. Stiller-Winkler, R., H. Idel und J.F. Hallauer: C3-Bestimmung im Serum bei Mäusen und Ratten.

(in Vorbereitung)

145. Stiller-Winkler, R., H. Idel, and J.F. Hallauer: Concentration of C3-component in sera of miners exposed to quartz-containing coal mine dust in comparison to animals exposed to pure quartz dust.

VI. Internationale Pneumokoniose-Konferenz vom 20.-23.9.1983 in Bochum. Vortrag.

146. Stiller-Winkler, R., H. Idel und U. Krämer: Konzentration der Komplementkomponente C3 im Serum von Bergleuten.

(in Vorbereitung)

147. Stiller-Winkler, R., U. Krämer, R. Dolgner und F. Fiedler: C3-Konzentration im Serum von Probanden aus unterschiedlich belasteten Gebieten Nordrhein-Westfalens.

(in Vorbereitung) 1983

148. Stiller-Winkler, R., M. Stark, H. Idel, and H.-W. Schlipköter: The humoral response of cancer patients against their tumor: A serologic study using xenotransplants.

Arbeitstagung "Menschliche Malignome auf nu/nu-Mäusen" vom 11.-12.3.1983 in Frankfurt/Main. Vortrag.

149. Sysojew, A.A., and G.I. Grigorow: Immunobiologitscheskije faktory krowi pri raslitschnom sostojanii schiwotnyh. (Immunobiological factors of the blood in various states in animals. Russ.)

Weterinarija 4 (1972), 113-114.

150. Tack, B.F., and J.W. Prahl: Third component of human complement: purification from plasma and physicochemical characterization.

Biochemistry 15 (1976), 4513-4521.

151. Tanner, E., A. Stelzner, H. Kunath, K.L. Jenatschek und B. Job: Komplementuntersuchungen bei rheumatischen Erkrankungen.

Z.Ges.Inn.Med. 27 (1972), 838-842.

152. Teisberg, P., and E. Gjone: Circulating conversion products of C3 in liver disease.

Clin.exp.Immunol. 14 (1973), 509-514.

153. Teisberg, P.: In vivo activation of C3 revealed by crossed immunoelectrophoresis as a parameter of immunological activity in disease.

Clin.Chim.Acta 62 (1975), 35-41.

154. Thomas, W.R., and P.G. Holt: Vitamin C and immunity an assessment of the evidence.

Clin.exp.Immunol. 32 (1978), 370-379.

155. Thomson, S., M.B. Edin, W.M. Arnott, and M.D. Edin: Blood complement in acute glomerulonephritis.

Lancet II (1939), 734-736.

156. Townes, A.S.: Topics in clinical medicine. Complement levels in disease.

Johns Hopkins Med.J. 120 (1967), 337-343.

157. Treutlein, E., J. Kult und A. Heidland: Bedeutung der post-operativen parenteralen Ernährung, gemessen am Proteinstoff-wechsel.

Jahrestagung der Dtsch.Ges.f. Anaesthesiologie und Wieder-belebung, 1974. Vortrag.

158. Tucker, E.S., and R.M. Nakamura: Abnormalities of the comple-ment.

In: Serum protein anormalities. Diagnostic and clinical aspects. Ed. by S.E. Ritzmann. Boston: Little Brown Company

159. Tuszkiewicz, M., M. Kalasiewicz, and M. Fijalka: Effect of irridation on complement level in cases of malignant tumour.

Ann.Immunol. 3 (1971), 79-81.

160. Ueki, A., and T. Kimoto: Crossed immunoelectrophoresis of human C3: electrophoretical heterogeneity among purified molecules.

Kawasaki Med.J. 8 (1982), 19-24.

161. Wahn, V., A. Baensch, H. Jürgens und U. Göbel: Das Komple-ment-System in der Diagnostik von Erkrankungen im Kindes-alter.

Der Kinderarzt 10 (1979), 1826-1828.

162. Wagner, V., M. Wagnerova, D. Wokounova, and J. Kriz: Seasonal and sex-related changes in the levels of immunoglobulins and lysozyme in all semicohort of children during a three-year period.

J.Hyg.Epidemiol.Microbiol.Immunol. 26 (1982), 187-203.

163. Wellensiek, H.J., and P.G. Klein: Multiple nature of the third component of guinea-pig complement. II. Separation and description of two additional factors ß and ∝; Preparation and characterization of four intermediate products.
Immunology 8 (1965), 604-617.

164. Wilken, H.: Das Serum-Komplement in der Schwangerschaft und bei Gestosen.
Zbl.Gynäkol. 35 (1963), 1225-1233.

165. Williams, B.D.: The complement system.
Br.J.Anaesth. 51 (1979), 7-11.

166. Wohl, H., and N.A. Ghossein: Complement levels before and after radiotherapy in cancer patients.
Oncology 25 (1971), 344-346.

167. World Health Organization: Nomenclature of complement.
Bull.WHO 39 (1968), 935.